

# **Qualitative und quantitative Analyse der Phosphorylierung von Proteinen der circadianen Uhr**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Erik Haaf**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Michael W. Linscheid  
2. Prof. Dr. Wolf Dieter Lehmann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2012



## Zusammenfassung

Die Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation von Proteinen spielt bei Signalwegen in Zellen eine große Rolle. Für die Entschlüsselung des molekularen Mechanismus der circadianen Uhr ist es daher von Interesse, die Phosphorylierungsstellen beteiligter Proteine zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proteine Period I und II mittels Flüssigkeitschromatographie und Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) auf Phosphorylierungsstellen untersucht. Hierbei lag der Fokus auf der Verbesserung bestehender Methoden, um eine bessere und umfassendere Identifizierung der Phosphorylierungsstellen, insbesondere in Bezug auf mehrfach phosphorylierte Peptide, zu erreichen. Der Arbeitsablauf beinhaltete die Verwendung mehrerer Proteasen, um eine hohe Sequenzabdeckung des Proteins zu erreichen. Nach der Proteolyse wurden die Phosphopeptide mittels Titandioxid angereichert. Hierbei und bei der LC-MS/MS-Analyse wurde Citrat als Additiv verwendet, welches eine bessere Chromatographie multiphosphorylierter Peptide ermöglicht. Bei der MS/MS-Analyse wurden CID und ETD als Fragmentierungsmethoden eingesetzt. Es konnten durch diese Methodik 30 bzw. 42 Phosphorylierungsstellen an den Proteinen Period I und II identifiziert werden, von denen 26 bzw. 14 zuvor nicht beschrieben waren. Nach der qualitativen Identifizierung wurden quantitative Varianten der optimierten Analytik untersucht, um die biologische Funktion der gefundenen Phosphorylierungsstellen untersuchen zu können. Hierbei wurden das metabolische Labeling der Zellen mit  $^{15}\text{N}$ -stickstoffhaltigen Aminosäuren und die säurekatalysierte Isotopenmarkierung auf Peptidebene mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff untersucht. Mit einer optimierten Variante der säurekatalysierten Isotopenmarkierung mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff lassen sich die Carboxygruppen der Peptide in 5 h 30 min mit einer Rate von  $>97\%$   $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff markieren. Mit dieser Methode können weitere funktionelle Untersuchungen der Phosphorylierung an den Period-Proteinen durchgeführt werden.

## Abstract

Protein phosphorylation, a posttranslational modification, plays an important role in signal cascades in cells. In order to understand the molecular mechanism of the circadian clock, it is thus of interest to identify the phosphorylation sites on proteins contributing to the system. During the work for this thesis, the proteins Period I and II were analyzed for phosphorylation sites with liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Hereby the focus was on improving existing methods in order to better identify multi-phosphorylated peptides. In the workflow, the Period proteins were digested with several proteases in order to archive a high sequence coverage for analysis. After proteolysis the phosphopeptides were subsequently enriched with titanium dioxide. During phosphopeptide enrichment and reversed phase chromatography, citrate was used as an additive for a better chromatography and recovery of multiphosphorylated peptides. During LC-MS/MS analysis, CID and ETD were used as fragmentation mechanisms in the mass spectrometer. Using these methods, 30 and 42 phosphorylation sites could be identified on the proteins Period I and II, respectively, including 26 and 14 which were

previously unpublished. In order to unravel the biological function of these phosphorylation sites, quantitative methods for the optimized LC-MS approach were investigated. This included the metabolic labeling of cells with amino acids containing  $^{15}\text{N}$ -nitrogen as well as acid catalyzed  $^{18}\text{O}$ -oxygen labeling on peptide level. The developed optimized variant of acid catalyzed  $^{18}\text{O}$ -oxygen labeling achieves an inclusion of  $^{18}\text{O}$ -oxygen at the peptide carboxy groups with a rate of  $>97\%$  in 5 h 30 min. This method can be used for further investigation of the biological function of the phosphorylation on the Period proteins.

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Schlosser für die exzellente Betreuung in der Core Facility Proteomics in Freiburg. Durch die Zusammenarbeit mit ihm als Mentor ergaben sich viele neue Ideen und es bot sich immer Zeit für interessante wissenschaftliche Diskussionen. Des Weiteren gab er mir die Möglichkeit innovative Ansätze auszuprobieren und die dafür notwendigen wissenschaftlichen Freiräume. Zudem bedanke ich mich für das mir von Anfang an entgegengebrachte Vertrauen in Bezug auf die Betreuung der technischen Ausrüstung der Core Facility.

Dem Team der Core Facility Proteomics der Universität Freiburg Stephanie Lamer, Ulrike Lanner, Robert Gawlik und Sebastian Hoernstein danke ich sowohl für die gute Zusammenarbeit als auch für die gute Zeit außerhalb des Labors. Sehr hilfreich für meine Tätigkeit waren die von Robert Gawlik entwickelten Softwareskripte. Ulrike Lanner danke für besonders für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für die wertvolle konstruktive Kritik.

Ebenfalls Dank sagen möchte ich Herrn Prof. Dr. Michael Linscheid für die Übernahme der Betreuung meines Promotionsvorhabens an der Humboldt-Universität zu Berlin.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Achim Kramer für die finanzielle Unterstützung meiner Tätigkeit und meines Projekts. Außerdem gilt ihm, Dr. Jens Vanselow und insbesondere Sabrina Wendt mein Dank für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Phosphorylierung von Proteinen der circadianen Uhr.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolf D. Lehmann für die Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten. Ihm und Dr. Jörg Seidler danke ich auch für die gute wissenschaftliche Kooperation auf dem Gebiet der besseren Phosphopeptidanalyse mittels LC-MS und für die Bereitstellung der Phosphopeptidmischung.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Nikolaus Ernsting, Herrn Prof. Dr. Erhard Kemnitz und Herrn Prof. Dr. Rainer Mahrwald für ihre Bereitschaft der Promotionskommission anzugehören.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern Simon und Hanne danke ich für die moralische Unterstützung während der vergangenen Jahre. Meiner Freundin Tessa Tielert danke ich für ihre Unterstützung, ihre Geduld, das Korrekturlesen meiner Arbeit und für die wertvolle konstruktive Kritik.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Proteinanalytik mittels Massenspektrometrie . . . . .	1
1.2	Instrumente . . . . .	1
1.2.1	ETD 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer . . . . .	2
1.2.2	Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer . . . . .	2
1.2.3	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer . . . . .	3
1.3	Qualitative Analyse von Proteinen . . . . .	5
1.3.1	Probenaufreinigung und Chromatographie . . . . .	5
1.3.2	Massenspektrometrie . . . . .	6
1.3.3	Datenanalyse . . . . .	6
1.4	Quantitative Analyse von Proteinen . . . . .	10
1.4.1	Relative und absolute Quantifizierung . . . . .	12
1.4.2	Labelfreie Quantifizierung . . . . .	12
1.4.3	Quantifizierung mittels stabiler Isotope . . . . .	13
1.4.4	Metabolisches Labeling mit stabilen Isotopen . . . . .	13
1.4.5	Chemisches Labeling mit stabilen Isotopen . . . . .	15
1.4.6	Phosphorylierungsspezifisches Labeling . . . . .	19
1.4.7	Absolute Quantifizierung mit Peptidstandards (AQUA) . . . . .	21
1.4.8	Quantifizierung mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) . . . . .	21
1.5	Phosphorylierung von Proteinen . . . . .	22
1.5.1	Vorkommen und biologische Bedeutung . . . . .	22
1.5.2	Qualitative Analyse der Proteinphosphorylierung . . . . .	24
1.6	Die circadiane Uhr bei Säugetieren . . . . .	24
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>31</b>
3.1	Chemikalien . . . . .	31
3.2	Proteine und Peptide . . . . .	31
3.3	Enzyme . . . . .	31
3.4	Präparation der mPER-Proteine aus HEK293-Zellen . . . . .	31
3.4.1	Zellernte . . . . .	32
3.4.2	Immunopräzipitation . . . . .	32
3.5	Gelelektrophorese und Probenvorbereitung . . . . .	33
3.5.1	Bio-Rad Gelsystem . . . . .	33

3.5.2	Invitrogen Gelsystem . . . . .	33
3.5.3	Färben der Gele . . . . .	34
3.5.4	Vorbereitung der Gelbanden für den Proteaseverdau . . . . .	34
3.6	Proteolytischer Verdau . . . . .	34
3.7	Online-Flüssigkeitschromatographie . . . . .	34
3.8	Massenspektrometer . . . . .	35
3.9	Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$ . . . . .	37
3.10	Datenanalyse . . . . .	40
3.10.1	Analyse der Rohdaten . . . . .	40
3.10.2	Vorprozessierung der Daten für die Datenbanksuche . . . . .	41
3.10.3	Datenbanksuche mit Mascot Server . . . . .	42
3.10.4	Datenanalyse bei der Bestimmung von Phosphosites . . . . .	42
3.10.5	Sequenz Alignment . . . . .	43
3.10.6	Berechnung von Isotopenmustern . . . . .	43
3.10.7	Quantifizierung . . . . .	44
<b>4</b>	<b>Phosphopeptidanreicherung mittels <math>\text{TiO}_2</math></b>	<b>45</b>
4.1	Einleitung . . . . .	45
4.2	Material und Methoden . . . . .	47
4.3	Ergebnisse . . . . .	47
4.3.1	Anreicherung monophosphorylierter Peptide . . . . .	48
4.3.2	Anreicherung multiphosphorylierter Peptide . . . . .	52
4.4	Diskussion . . . . .	54
<b>5</b>	<b>Identifizierung von Interaktionspartnern des Proteins mPER2</b>	<b>55</b>
5.1	Material und Methoden . . . . .	55
5.2	Ergebnisse . . . . .	55
5.2.1	Identifizierte Interaktionspartner von mPER2 . . . . .	55
5.2.2	Verkürzte Versionen von mPER1 und mPER2 . . . . .	59
5.3	Diskussion . . . . .	62
<b>6</b>	<b>Qualitative Analyse der Phosphorylierung und anderer PTM der mPER Proteine</b>	<b>63</b>
6.1	Einleitung . . . . .	63
6.1.1	MS-Analytik von Phosphopeptiden . . . . .	63
6.1.2	ETD-Fragmentierung von multiphosphorylierten Peptiden . . . . .	64
6.1.3	Phosphorylierung der Period-Proteine . . . . .	65
6.2	Material und Methoden . . . . .	65
6.2.1	Probenvorbereitung . . . . .	65
6.2.2	Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$ . . . . .	65
6.2.3	LC-MS Methodik . . . . .	65
6.2.4	Datenanalyse . . . . .	68
6.3	Ergebnisse . . . . .	68
6.3.1	Phosphorylierung von mPER1 . . . . .	68



6.3.2	Phosphorylierung von mPER2 . . . . .	68
6.3.3	Vergleich der Phosphorylierung von mPER1 und mPER2 . . . . .	73
6.3.4	Phosphoisomere multiphosphorylierter Stellen von mPER1 und mPER2 . . . . .	76
6.3.5	Weitere mögliche gemeinsame Phosphorylierungscluster . . . . .	83
6.3.6	Weitere posttranslationale Modifikationen . . . . .	83
6.4	Diskussion . . . . .	86
<b>7</b>	<b>Labelfreie Bestimmung des Phosphorylierungsgrades</b>	<b>89</b>
7.1	Einleitung . . . . .	89
7.2	Material und Methoden . . . . .	90
7.3	Ergebnisse . . . . .	91
7.4	Diskussion . . . . .	96
<b>8</b>	<b>Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen durch chemisches Labeling</b>	<b>99</b>
8.1	Einleitung . . . . .	99
8.2	Material und Methoden . . . . .	100
8.3	Ergebnisse . . . . .	101
8.3.1	Guanidierung der freien Lysine mit O-Methylisoharnstoff zum Homoarginin . . . . .	101
8.3.2	Veresterung mit Ameisensäure und <i>N-N'</i> -Carbonyldiimidazol . . . . .	104
8.3.3	Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid und Pyridin . . . . .	107
8.3.4	Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid und Trifluoressigsäure in Tetrahydrofuran . . . . .	108
8.3.5	Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid und Essigsäure in Tetrahydrofuran mit anschließender Dephosphorylierung . . . . .	108
8.3.6	Veresterung mit Acetanhydrid bzw. Acetylchlorid und Pyridin . . . . .	112
8.3.7	Steglich-Veresterung mit Acetanhydrid und 4-Pyrrolidinopyridin und <i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid . . . . .	112
8.3.8	Lewis-Säure-katalysierte Veresterung . . . . .	112
8.3.9	Veresterungsversuche am Protein . . . . .	115
8.3.10	Dephosphorylierung mit Lanthanoidverbindungen . . . . .	116
8.3.11	$\beta$ -Eliminierung mit Lanthanoidverbindungen . . . . .	119
8.4	Diskussion . . . . .	124
<b>9</b>	<b>Relative Quantifizierung der mPER2-Phosphorylierung mittels <math>^{15}\text{N}</math>-Labeling</b>	<b>125</b>
9.1	Einleitung . . . . .	125
9.2	Material und Methoden . . . . .	127
9.2.1	$^{15}\text{N}$ -Labeling der Zellen . . . . .	127
9.2.2	Zellernte . . . . .	128
9.2.3	Probenvorbereitung und Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$ . . . . .	128
9.3	Ergebnisse . . . . .	129
9.3.1	Qualität des Labelings . . . . .	129
9.3.2	Ergebnisse der Quantifizierung mit $^{15}\text{N}$ markierten Proben . . . . .	131

## Inhaltsverzeichnis

9.4 Diskussion . . . . .	140
<b>10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels <math>^{18}\text{O}</math>-Labeling</b>	<b>141</b>
10.1 Einleitung . . . . .	141
10.1.1 Proteasekatalysiertes $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	141
10.1.2 Säurekatalysiertes $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	142
10.2 Material und Methoden . . . . .	143
10.3 Ergebnisse . . . . .	145
10.3.1 Optimierung der Labelingmethode an Peptiden . . . . .	145
10.3.2 Einbau von $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff bei weiteren Aminosäuren . . . . .	167
10.3.3 $^{18}\text{O}$ -Labeling an Phosphopeptiden von PKA . . . . .	171
10.3.4 $^{18}\text{O}$ -Labeling an Proteinen . . . . .	173
10.4 Diskussion . . . . .	175
<b>11 Abschließende Zusammenfassung und Diskussion</b>	<b>177</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>181</b>
<b>Anhang</b>	<b>203</b>
1 Sequenzvergleich der mPER Proteine . . . . .	204
2 Phosphoisomere von mPER1 . . . . .	206
3 Phosphoisomere von mPER2 . . . . .	211
4 Sequenzen der verwendeten Peptidstandards . . . . .	222
5 Sequenzen der verwendeten Proteinstandards . . . . .	224
6 Ergebnisse des ersten Versuchs mPER2 und PP2A ( $^{15}\text{N}$ -Labeling) . . . . .	228
7 Pepview-Ergebnisse Dionex Mix unbehandelt - behandelt mit HCl . . . . .	232
8 Mascot-Scoring des Dionex Mix beim $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	244
9 Pepview Ausgabe . . . . .	247
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>251</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>255</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>261</b>
<b>Konferenzbeiträge und Publikationen</b>	<b>263</b>
<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>265</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Proteinanalytik mittels Massenspektrometrie

Die Einführung sanfter Ionisierungsmethoden wie *Electrospray Ionisation* (ESI) (Fenn et al., 1989), *Soft Laser Desorption* (SLD) (Tanaka et al., 1988) und *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI) (Karas et al., 1987) ermöglichte den Einsatz der Massenspektrometrie für die Analytik von Biomolekülen. Durch diese Methoden ist es möglich, große Biomoleküle wie Proteine, Peptide und Lipide sanft in die Gasphase des Massenspektrometers zu überführen, ohne diese zu fragmentieren. Dies hat dazu geführt, daß heute Massenspektrometrie die Analytikmethode der Wahl im Bereich der Proteinanalytik und „Proteomics“ ist. Proteomics beschreibt dabei analog zum Begriff Genomics das Ziel, alle Proteine einer Zelle oder eines Gewebes zu einem bestimmten Zeitpunkt qualitativ und auch quantitativ zu erfassen (Anderson und Anderson, 1998; Blackstock und Weir, 1999).

## 1.2 Instrumente

Für die Proteinanalyse mittels Massenspektrometrie kommen heute vor allem Tandemmassenspektrometer (Hybridmassenspektrometer und Ionenfallen) zum Einsatz. Als Hybridmassenspektrometer werden dabei Massenspektrometer bezeichnet, welche mehrere Massenanalysatoren unterschiedlichen Typs besitzen. Alle Massenspektrometer messen das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von positiv oder negativ geladenen Ionen. Dies geschieht mittels der Manipulation der Ionenflugbahnen im elektrischen oder magnetischen Feld. Dabei kommen Massenanalysatoren unterschiedlicher Bauweise wie z. B. lineare und 3D-Ionenfallen, Quadrupol-, *Time of flight*- (TOF), Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz- (FTICR) und Orbitrap-Massenanalysatoren zum Einsatz (Lehmann und Schlosser, 2011). Gängige Kombinationen sind dabei die Kombination von Quadrupol und *Time of flight*-Massenanalysatoren (Q-TOF) und die Kombination von linearen Ionenfallen mit FTICR- und Orbitrap-Massenanalysatoren.

Als weitere Eigenschaft zeichnen sich Tandemmassenspektrometer dadurch aus, dass es möglich ist, die ins Gerät geleiteten Ionen in oder nach dem ersten Massenanalysator zu fragmentieren. Dieses bezeichnet man als MS/MS- oder MS<sup>2</sup>-Experiment. Bei Geräten mit einer Ionenfalle als erstem Massenanalysator findet die Fragmentierung meistens in dieser statt, bei den anderen Geräten wird eine gesonderte Kollisionszelle zwischen den Massenanalysatoren für die Fragmentierung verwendet. Die wichtigste Fragmentierungstechnik ist dabei *Collision Induced Dissociation* (CID), welche auch *Collision Activated Dissociation* (CAD) genannt wird. Daneben spielen mittlerweile die Aktivierungsmetho-

## 1 Einleitung

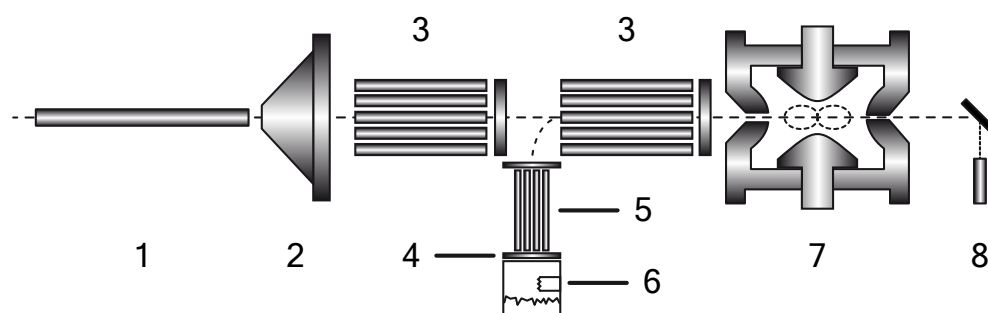
den *Electron Capture Dissociation* (ECD) (Zubarev et al., 2000) bei FTICR-Systemen und *Electron Transfer Dissociation* (ETD) (Syka et al., 2004) bei Ionenfallen-, Q-TOF- und Orbitrap-Massenanalysatoren besonders bei der Analyse von posttranslationalen Modifikationen eine größere Rolle. Daneben existieren noch weitere Fragmentierungstechniken wie *Infrared Multiphoton Dissociation* (IRMPD), *Blackbody Infrared Radiative Dissociation* (BIRD), *Electron Detachment Dissociation* (EDD) und *Surface Induced Dissociation* (SID), welche allerdings weniger verbreitet sind.

### 1.2.1 ETD 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer

Beim ETD 3D-Ionenfallen-Massenspektrometer werden die Ionen über eine Transferkapillare, Octopole und Linsen in die eigentliche 3D-Ionenfalle transferiert. Dort werden sie durch Variation der anliegenden Spannungen nacheinander aus der Falle geleitet und im Detektor gemessen, siehe Abbildung 1.1 auf der nächsten Seite. Für die Aufnahme eines Fragmentspektrums mit CID (CID-MS<sup>2</sup>-Spektrum) werden die Precursor-Ionen in der Falle isoliert und anschließend nach Anregung im elektrischen Feld durch Kollision mit den Atomen des Kollisionsgases Helium fragmentiert. Für ein ETD-Fragmentspektrum werden die Ionen ebenfalls in der Falle isoliert und anschließend Fluoranthren-Anionen aus der CI-Quelle in die Ionenfalle geleitet. Dort reagieren die Radikal-Anionen mit den Peptid-Kationen. Dabei wird vom Anion ein Elektron auf das Peptid-Kation übertragen und es entsteht ein Radikal-Kation. Dieses ist instabil und die radikalische Fragmentierungsreaktion findet statt. Nach der Fragmentierung werden die Fragment-Ionen wieder für die Aufnahme eines Massenspektrums nacheinander aus der Ionenfalle geleitet oder erneut für ein MS<sup>n</sup>-Spektrum isoliert und fragmentiert. Bei der Erstellung des Fragmentpektrums in der Ionenfalle handelt es sich daher um ein zeitlich getrenntes MS/MS-Experiment. Ionenfallen-Massenspektrometer besitzen mehrere Vorteile. Neben der Möglichkeit MS<sup>n</sup>-Spektren zu erzeugen besitzen sie eine hohe Sensitivität, da die Ionenfalle mit einer größeren Anzahl an Ionen gefüllt werden kann, bis der Scanvorgang gestartet wird. Außerdem können aktuelle Ionenfallen Massenspektren in schneller Reihenfolge aufnehmen. Nachteilig sind bei Ionenfalle-Massenspektrometern die geringe Massengenauigkeit und Auflösung sowie ein Verlust von Ionen im niederen Massenbereich bei CID-MS<sup>2</sup>-Fragmentspektren. Weitere Informationen zu Ionenfallen-Massenspektrometern finden sich bei Douglas et al. (2005) und Riter et al. (2006), Informationen zur ETD-Fragmentierung finden sich bei Syka et al. (2004) und Mikesch et al. (2006).

### 1.2.2 Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer

Beim Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer (Q-TOF) werden die Ionen nach der Ionisation in der Quelle durch eine Transferkapillare, Octopole, Linsen, einen Quadrupol und eine Kollisionskammer bis in den Time-of-Flight Teil des Massenspektrometers geleitet, siehe Abbildung 1.2 (Seite 4). Dort werden die Ionen durch einen Pusher in einem orthogonalen Vektor beschleunigt und auf eine Flugbahn geleitet. Diese Flugbahn führt bei modernen TOF-Geräten über einen Ionenspiegel (Reflektor), welcher die Flugstrecke verlängert und die Ionen refokussiert. Dies verbessert die Auflö-



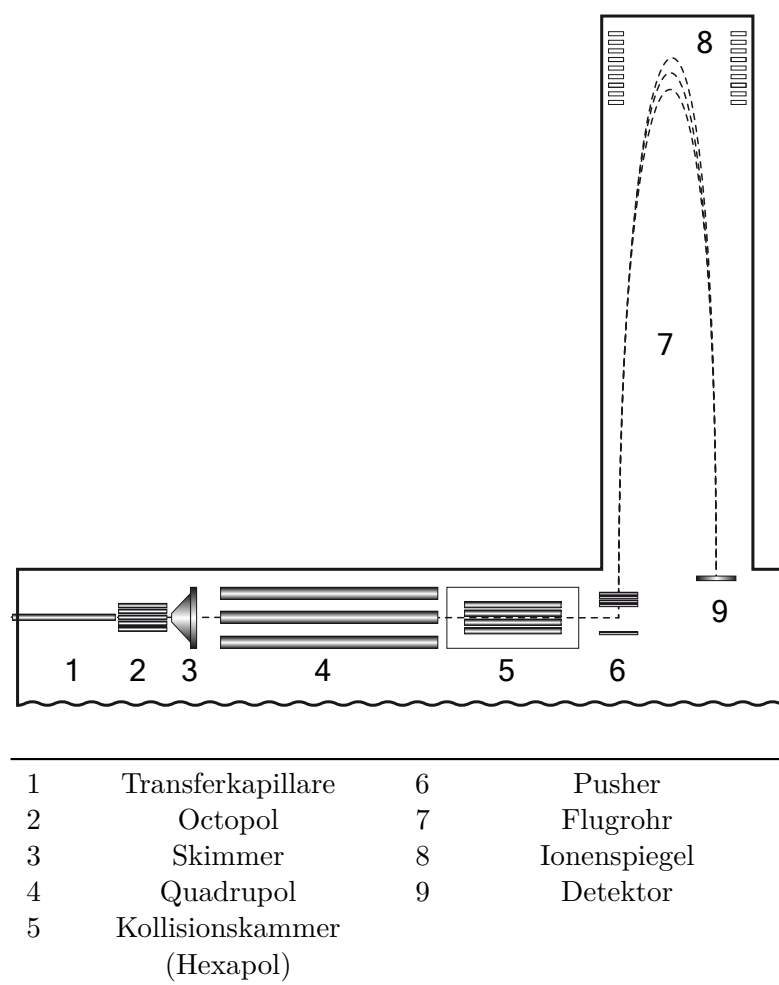
1	Transferkapillare	6	CI-Quelle
2	Skimmer	7	3D-Ionenfalle
3	Octapol mit Linse	8	Detektor
4	Sperrlinse		
5	Transfer-Hexapol		

**Abbildung 1.1** – Schematischer Aufbau eines ETD 3D-Ionenfallen-Massenspektrometers

sung des Gerätes. Die Ionen treffen anschließend auf dem Detektor, auf was zu einem elektrischen Signal führt. Dabei korreliert die Flugzeit der Ionen mit ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis. Ionen mit einem kleinen Masse-zu-Ladungsverhältnis treffen hierbei früher am Detektor ein als Ionen mit einem großem Masse-zu-Ladungsverhältnis. Bei MS-Experimenten ist der Quadrupol so eingestellt, dass alle Ionen durchgelassen werden (*RF-only mode*) und vor der Kollisionskammer liegt keine Beschleunigungsspannung an. Bei MS<sup>2</sup>-Experimenten wird der Quadrupol so eingestellt, dass nur Ionen in einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Bereich ihn auf einer stabilen Flugbahn passieren können. Anschließend werden die Ionen vor der Kollisionskammer mittels eines elektrischen Feldes beschleunigt und durch Kollision mit dem Kollisionsgas Stickstoff mittels eines CID-Mechanismus fragmentiert. Die Fragment-Ionen werden anschließend im Time-of-Flight-Massenanalysator gemessen. Vorteile des Q-TOF-Massenspektrometers sind eine hohe Massengenauigkeit (~5 ppm) und eine hohe Auflösung bei MS- und MS<sup>2</sup>-Experimenten (in der Regel >10 000). Nachteilig gegenüber Ionenfallen ist die geringere Sensitivität. Weitere Informationen finden sich unter anderem im Artikel von Morris et al. (1996).

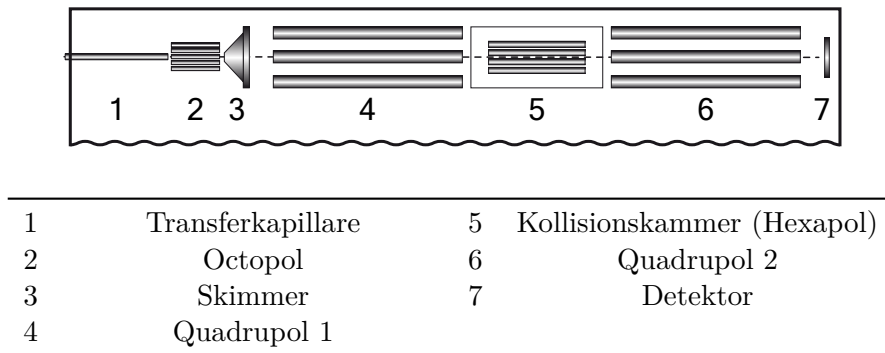
### 1.2.3 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer

Bei Triple-Quadrupol-Massenspektrometern (3Q) sind zwei Quadrupol-Massenanalytoren hintereinander geschaltet, zwischen denen sich eine Kollisionskammer befindet (siehe Abbildung 1.3, Seite 5). Die Quadrupole können dabei so geschaltet werden, dass entweder alle oder nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis sie auf einer stabilen Flugbahn passieren können. So können die beiden Quadrupole als Massenfilter mit unterschiedlichen Parametern genutzt werden.



**Abbildung 1.2** – Schematischer Aufbau eines Q-TOF Massenspektrometers

Dies wird beim sogenannten *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) (auch *Single Reaction Monitoring* (SRM) genannt) angewandt. Der erste Quadrupol wird dabei auf eine bestimmte Precursor-Ionen-Masse, zum Beispiel eines Peptids, eingestellt. Dieses wird anschließend in der Kollisionskammer fragmentiert. Der zweite Quadrupol wird so eingestellt, dass abwechselnd Ionen mit den Massen von Fragmenten dieses spezifischen Peptids ihn passieren können. Somit erhält man am Detektor nur die Signale von Fragmentmassen eines definierten Peptids. Dies bezeichnet man als Übergang. Durch die Definition mehrerer Übergänge kann man so aus einer komplexen Probe mit hoher Selektivität die gesuchten Peptide detektieren. Allerdings ergeben sich dabei keine MS- und MS<sup>2</sup>-Spektren wie in Abbildung 1.4 (Seite 7), sondern Chromatogramm-Spuren für die einzelnen Übergänge. Mit dieser Methodik kann man sehr gezielt Substanzen aus komplexen Mischungen quantifizieren. Je nach Komplexität der Probe sind dafür allerdings aufgrund der relativ geringen Massengenauigkeit 4–8 Übergänge für eine selektive



**Abbildung 1.3** – Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers

Analyse notwendig. Da das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer außerdem über einen sehr großen linearen Messbereich verfügt, ist es ein beliebtes Instrument für quantitative Messungen. In den letzten Jahren haben die Triple-Quadrupol-Massenspektrometer daher im Bereich der Quantitativen Proteomics an Bedeutung gewonnen (Barnidge et al., 2003; Gerber et al., 2003; Lange et al., 2008). Weitere Information zu Triple-Quadrupol-Massenspektrometern finden sich bei Yost und Enke (1978, 1979).

### 1.3 Qualitative Analyse von Proteinen

Die Analyse von Proteinen mittels Flüssigchromatographie (*Liquid chromatography* LC) und Massenspektrometrie (LC-MS) kann prinzipiell mittels zwei verschiedener Strategien erfolgen. Bei der *Top-Down*-Variante werden komplette Proteine oder Proteinkomplexe mittels Flüssigchromatographie und Elektrospray-Ionisations-Schnittstelle (LC-ESI) im Massenspektrometer gemessen. Bei der *Bottom-up*-Variante hingegen werden die Proteine vor der Messung im Massenspektrometer einem Proteaseverdau unterzogen, wodurch sie je nach Protease in spezifische Peptide gespalten werden. Diese Variante hat gegenüber der *Top-Down*-Variante den Vorteil, dass sich zum einen die Datenauswertung durch das Generieren spezifischer Peptide vereinfacht. Zum anderen ist die Chromatographie von Proteinen im Vergleich zu Peptiden problematischer, so besteht zum Beispiel das Risiko einer Fällung der Proteine unter LC-Bedingungen. Außerdem ist die chromatographische Auftrennung von Proteinen normalerweise schlechter als die von Peptiden. Durch den proteolytischen Verdau bei der *Bottom-Up*-Variante kommt es zwar zu Materialverlusten, diese werden jedoch durch die Vorteile aufgewogen. Die *Bottom-Up*-Variante ist daher bei der Proteinanalytik mittels LC-MS vorherrschend.

#### 1.3.1 Probenaufreinigung und Chromatographie

Aufgrund der Komplexität der biologischen Proben werden vor dem proteolytischen Verdau ein oder mehrere Trenn- und Aufreinigungsschritte durchgeführt, um die Proben-

## 1 Einleitung

komplexität zu reduzieren. Dies können zum Beispiel eine 1D- oder 2D-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), eine Isoelektrische Fokussierung (IEF), eine Ionenaustauschchromatographie (zum Beispiel SCX), eine Größenausschlusschromatographie oder eine Immunopräzipitation sein. Ein Beispiel für die Arbeitsschritte der Proteinaufreinigung mittels 1D-Gelelektrophorese nach Immunopräzipitation ist in Abbildung 3.4 auf Seite 38 aufgeführt.

Die durch den proteolytischen Verdau gewonnenen Peptide werden anschließend in einem *High Performance liquid chromatography*-System (HPLC) mittels einer *Reversed-phase*-Chromatographie über ein C<sub>18</sub>-Chromatographiematerial ihrer Hydrophobizität entsprechend zeitlich aufgetrennt. Dabei findet das Beladen der C<sub>18</sub>-Trennsäule normalerweise unter Anwendung eines hydrophilen Lösungsmittels wie Wasser statt. Die Elution der Peptide von der Trennsäule wird in den meisten Methoden mittels eines steigenden Gradienten eines hydrophoberen Lösungsmittels wie Acetonitril (ACN) oder Methanol erreicht. Einen Überblick über die chromatographische Trennung mittels HPLC bietet dabei das Review von LaCourse (2002).

### 1.3.2 Massenspektrometrie

Im Tandemmassenspektrometer erfolgt die Analyse der Peptide normalerweise im datenabhängigen Modus in zwei Schritten, siehe Abbildung 1.4 (Seite 7). Im ersten Schritt wird ein MS-Spektrum aufgenommen. Dabei werden die Peptide im ersten Massenanalysator und in der Kollisionszelle nicht fragmentiert und passieren diese ungehindert. Anhand des aufgenommenen MS-Massenspektrums wird anschließend unter anderem der Ladungszustand der intensivsten Signale bestimmt und aufgrund von in der Software des Massenspektrometers festgelegten Kriterien Peptide für folgende MS<sup>2</sup>-Experimente ausgewählt. Im Massenspektrum wird die Signalintensität gegenüber dem Masse-zu-Ladungsverhältnis der Peptid-Ionen aufgetragen.

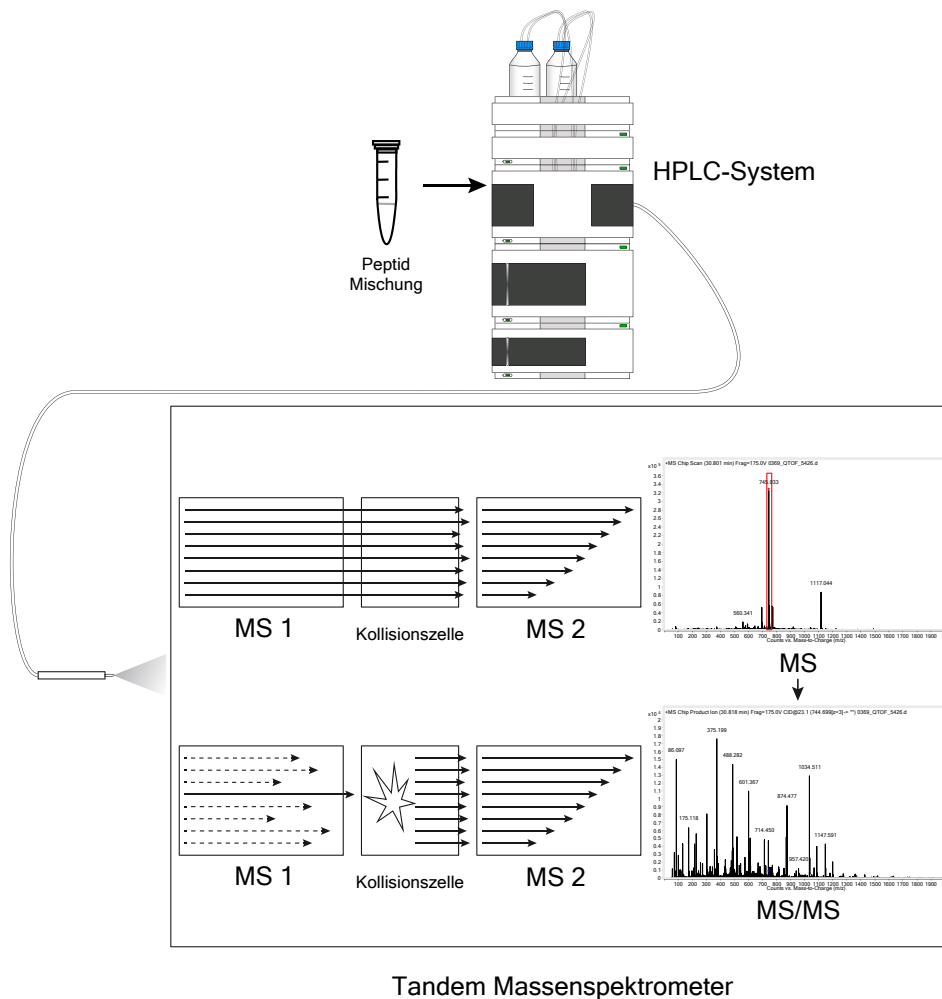
Der Ladungszustand lässt sich dabei mit Hilfe des natürlich vorhandenen Verhältnisses von 1,1 % <sup>13</sup>C-Kohlenstoff in der Probe im MS-Spektrum erkennen. Durch den Einbau des Isotops ergeben sich Peptidspezies, welche ein oder mehrere <sup>13</sup>C-Kohlenstoffe enthalten. Da diese eine um 1 Da höhere Masse haben, kann man im Spektrum anhand des Abstandes der Isotopenpeaks den Ladungszustand der Peptid-Ionen ablesen (Abbildung 1.5, Seite 8). Anschließend wird eine in der Software festgelegte Anzahl von MS<sup>2</sup>-Experimenten durchgeführt. Bei diesen wird das im MS detektierte Peptid im ersten Massenanalysator selektiert. Hierbei werden nur Ionen in einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Bereich durch den ersten Massenanalysator gelassen bzw. bei Ionenfallen dort isoliert. Anschließend wird durch Fragmentierung mittels CID oder einer anderen Fragmentierungsmethode das Peptid in Bruchstücke gespalten. Diese werden dann im zweiten Massenanalysator gemessen.

### 1.3.3 Datenanalyse

Aus den im Massenspektrometer gemessenen Peptidmassen und den Massen der Peptidfragmente lassen sich in der Datenanalyse anschließend partielle Sequenzinformationen ableiten, durch welche das Peptid identifiziert werden kann. Die Benennung der Pep-



### 1.3 Qualitative Analyse von Proteinen

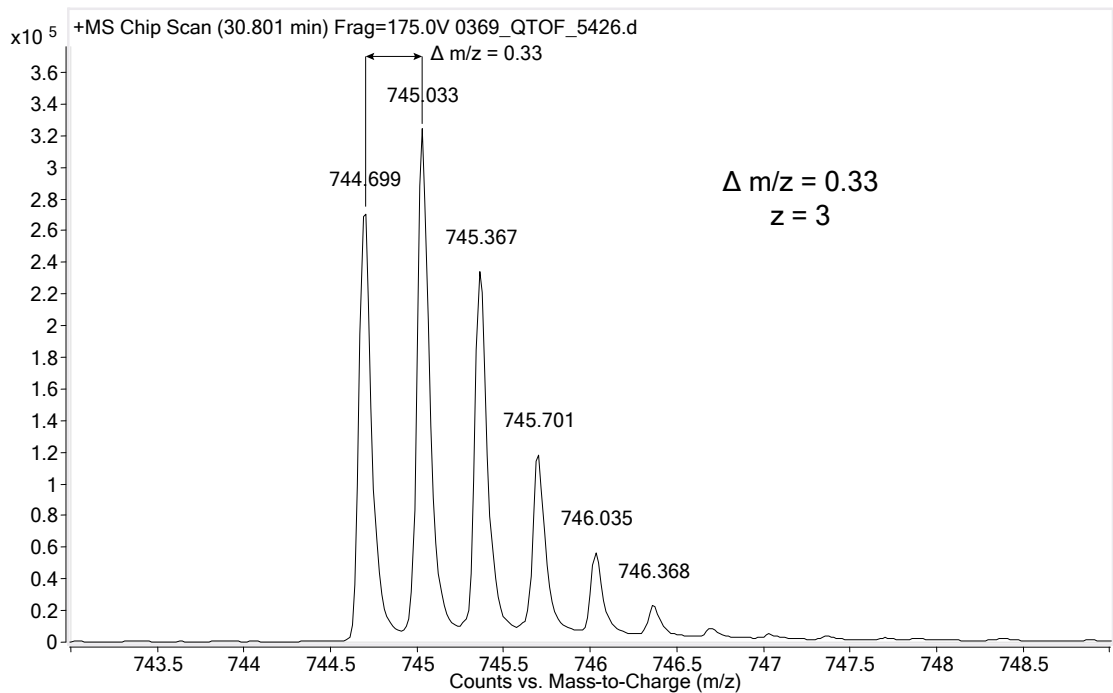


**Abbildung 1.4** – Ablauf der Proteinanalyse mittels LC-MS/MS, 1. Schritt: Erfassen des Massenspektrums der vollständigen Peptide; 2. Schritt: Isolierung eines Peptids und Erfassen seines Fragmentspektrums

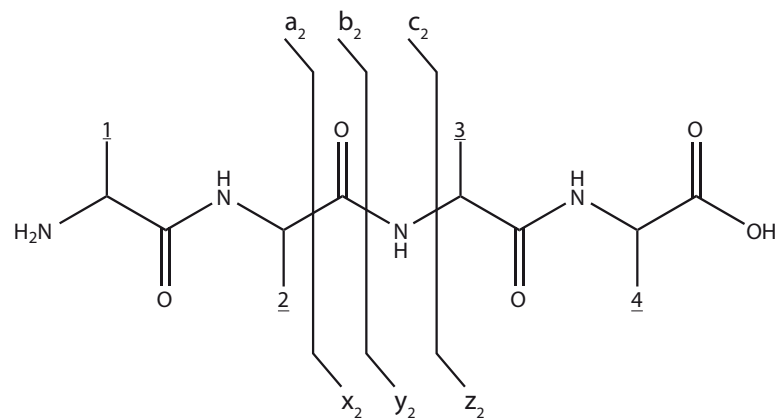
tidfragmente folgt dabei einer Nomenklatur, welche von Roepstorff und Fohlman (1984) vorgeschlagen wurde und welche meist in vereinfachter Form nach Biemann (1990) verwendet wird. Das Schema der Nomenklatur ist in Abbildung 1.6 (Seite 8) abgebildet. Bei der Fragmentierung durch CID treten vorwiegend Fragmente als b- und y-Ionen auf, bei der ECD- und ETD-Fragmentierung c- und z-Ionen. Da die Fragmentierung des Peptidgrundgerüsts an verschiedenen Bindungen stattfindet, treten im MS<sup>2</sup>-Spektrum Serien von Fragment-Ionen auf. Diese können je nach Zusammensetzung des Peptids mehr oder weniger ausgeprägt sein.

Die Serien der Fragment-Ionen enthalten Informationen über die Peptidsequenz, da die Massendifferenzen zwischen den einzelnen Fragmenten einer Serie den Massen einzelner Aminosäuren entsprechen. Dadurch kann man aus den gewonnen Informationen durch

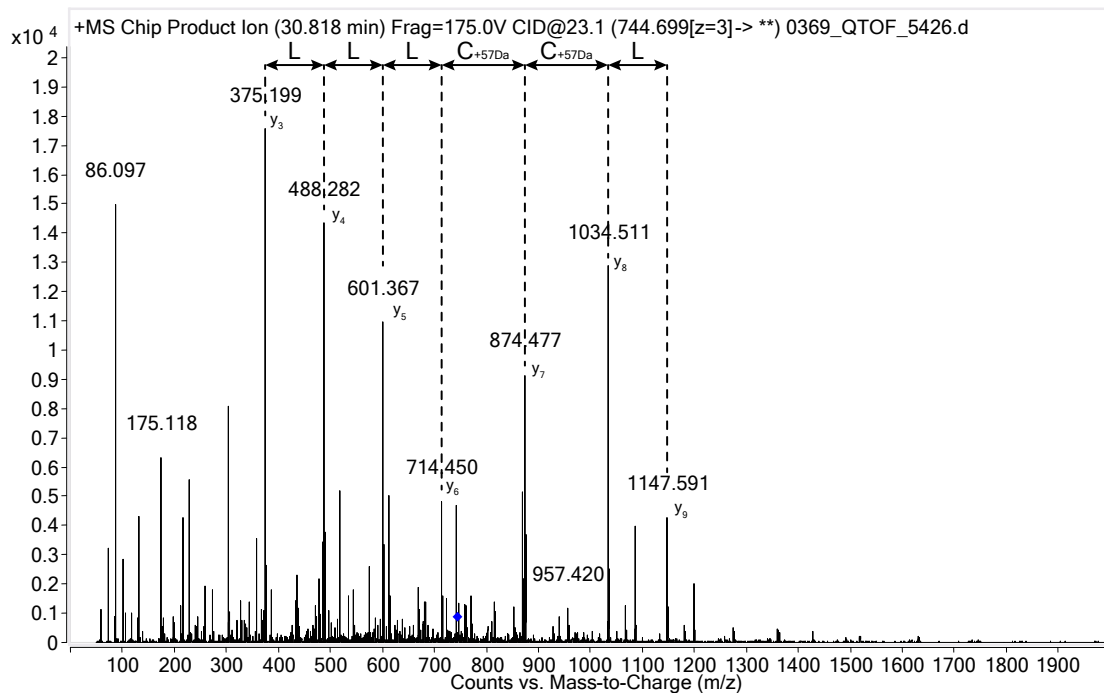
## 1 Einleitung



**Abbildung 1.5** – Bestimmung des Ladungszustandes aus dem MS1-Spektrum, durch das Isotopenmuster des  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffes und dem Abstand der Isotopenpeaks im  $m/z$ -Spektrum lässt sich der Ladungszustand des Peptides ermitteln.



**Abbildung 1.6** – Nomenklatur für Peptidfragmente nach Biemann (1990); die Fragmente durch Spaltung nach der zweiten Aminosäure werden in Richtung N-Terminus mit  $a_2$ ,  $b_2$ ,  $c_2$  in Richtung C-Terminus mit  $x_2$ ,  $y_2$ ,  $z_2$  bezeichnet.



**Abbildung 1.7** – Sequenzinformation im MS<sup>2</sup>-Spektrum, die Sequenz entspricht den Massendifferenzen der Aminosäuren in einer b- oder y-Ionenreihe im Fragmentspektrum (die blaue Raute im Spektrum zeigt die Position des fragmentierten Precursors an).

*De-Novo*-Sequenzierung Teile der Aminosäuresequenz der Peptide bestimmen, siehe Abbildung 1.7. Alternativ lassen sich Sequenzinformationen durch den Abgleich mit Proteindatenbanken wie zum Beispiel Swissprot oder NCBI bestimmten Peptiden zuordnen. Da viele Proteine spezifische Peptide besitzen, können somit auch die entsprechenden Proteine identifiziert werden. Die Software geht dabei von einer bekannten Proteinsequenz aus, welche *in silico* verdaut wird, um mögliche Peptide zu bestimmen. Die Massen dieser theoretischen Peptide und die daraus berechneten Fragmentspektren werden anschließend mit den gemessenen Daten über die Masse im Massenspektrum (Henzel et al., 1993; Mann et al., 1993; Yates et al., 1993; Pappin et al., 1993; James et al., 1993) und die Fragmente im Fragmentspektrum (Eng et al., 1994) abgeglichen.

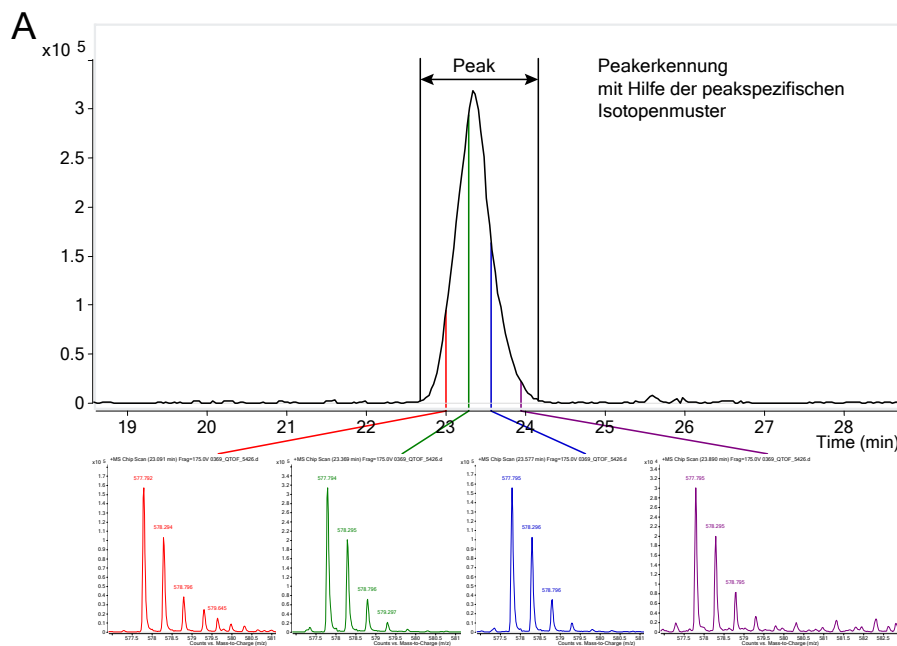
Für die Datenbanksuche und die *De-Novo*-Sequenzierung werden die vom Massenspektrometer aufgenommenen Rohdaten normalerweise vorprozessiert. Diese Vorprozessierung beinhaltet mehrere Schritte. Bei der für diese Arbeit verwendeten Software Mascot Distiller beinhaltet diese Vorprozessierung vier Schritte, siehe Abbildungen 1.8 und 1.9 (Seiten 10 und 11).

Als erster Schritt erfolgt dabei eine Peakerkennung, bei welcher anhand der Isotopenmuster im MS-Spektrum zusammengehörnde Spektren eines Peptids identifiziert werden. Im zweiten Schritt erfolgt anschließend eine Deisotopisierung. Dabei werden die

## 1 Einleitung

Isotopenpeaks auf das monoisotopische Signal hinzugerechnet. Im dritten Schritt erfolgt dann die Mittelwertbestimmung (*Centroiding*) der monoisotopischen Masse. Dabei wird das  $m/z$ -Verhältnis des Peaks über den Peakverlauf gemittelt. Dieser  $m/z$ -Wert wird in den vorprozessierten Daten als Peptidmasse für die Datenbanksuche gesetzt. Im vierten Schritt werden zusätzlich optional die MS/MS-Spektren des gleichen Precursors aufsummiert, um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu bekommen.

Wenn Aminosäuren durch kovalente Modifikationen wie zum Beispiel Methylierung oder Phosphorylierung verändert wurden, so können diese ebenfalls aufgrund bestimmter Massendifferenzen identifiziert werden. Eine Übersicht über die Proteinanalytik mittels LC-MS auch in Bezug auf die Analyse von posttranslationalen Modifikationen bieten die Reviews von Cravatt et al. (2007); Jensen (2006) und Gygi und Aebersold (2000).

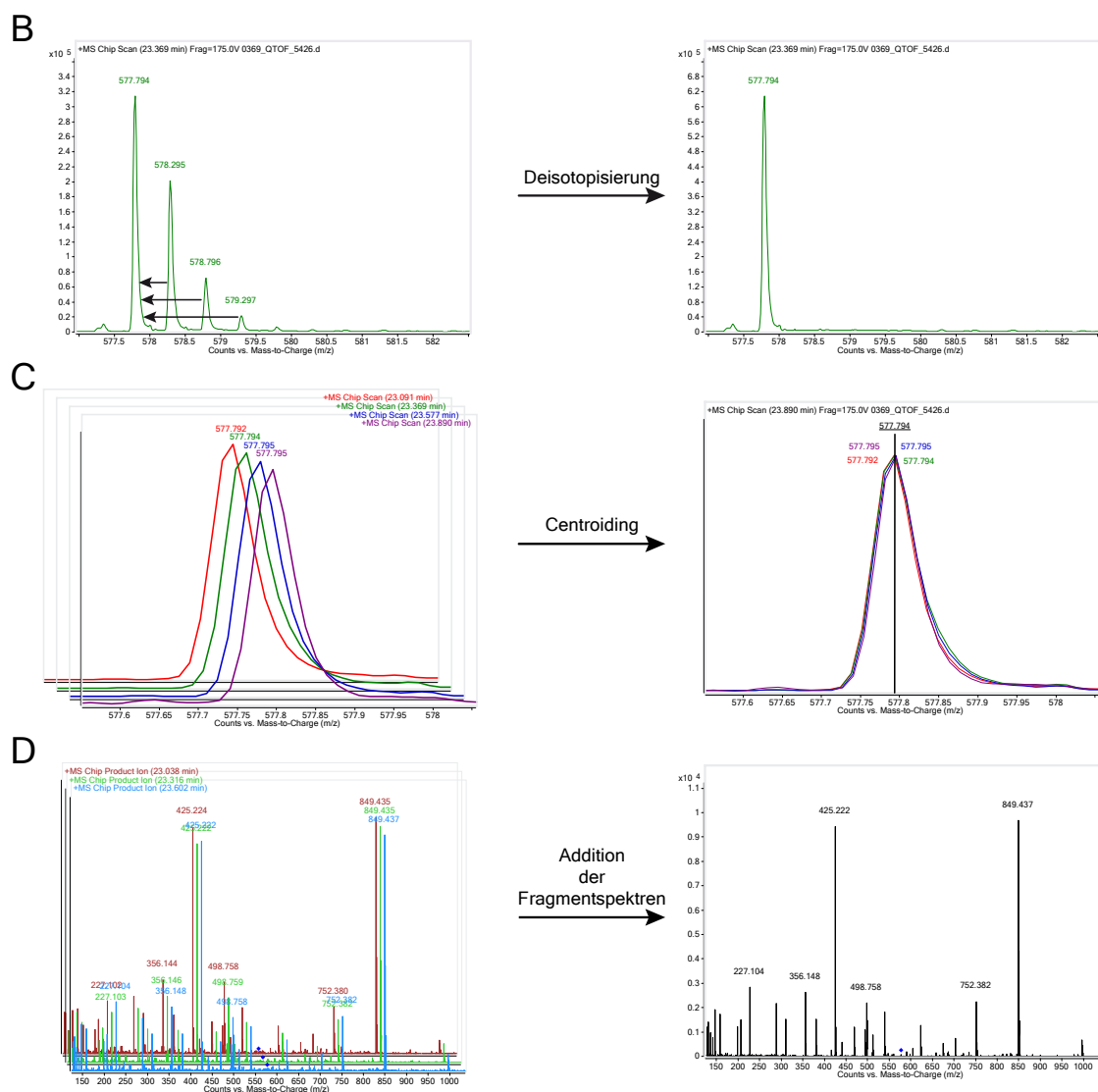


**Abbildung 1.8** – Prozessierung der Massenspektrometrie Rohdaten Teil 1; In der Software Mascot Distiller wird zuerst eine Peakerkennung durchgeführt (A).

## 1.4 Quantitative Analyse von Proteinen

Da mit Massenspektrometern keine absoluten Messwerte aufgenommen werden können, ist es für die quantitative Analyse notwendig, Proben immer im Vergleich zu einer Referenz zu messen. Diese Referenz kann als interner Standard oder externer Standard gemessen werden. Der interne Standard wird dabei gleichzeitig mit dem Analyten in einem Messlauf, der externe Standard hingegen in einer separaten Messung gemessen. Je nach Methode unterscheidet sich dabei die Probenvorbereitung. In Abbildung 1.10 (Seite 12) sind die Arbeitsabläufe verschiedener Quantifizierungsmethoden mittels Mas-

## 1.4 Quantitative Analyse von Proteinen

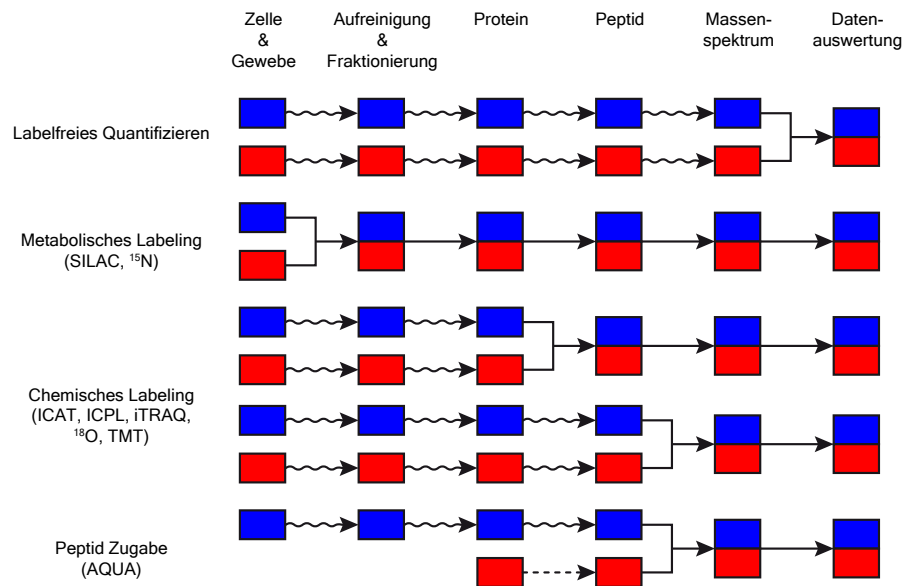


**Abbildung 1.9** – Prozessierung der Massenspektrometrie Rohdaten Teil 2; Im Anschluss an die Peakerkennung werden die Peaks Deisotopisiert (B), es wird eine Mittelwertbestimmung (*Centroiding*) durchgeführt (C), Optional werden die Fragmentspektren der Peaks addiert (D).

senspektrometrie dargestellt. Gewellte Pfeile stehen dabei für parallel durchgeführte Arbeitsschritte, bei welchen es zu Abweichungen der Bedingungen kommen kann.

Eine Übersicht über die verschiedenen Ansätze zu Quantitativen Proteomics bieten die Reviews von Elliott et al. (2009), Ong und Mann (2005) und Bantscheff et al. (2007).

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.10** – Arbeitsabläufe verschiedener Quantifizierungsmethoden mittels Massenspektrometrie; gewellte Pfeile: mögliche Störfaktoren bei der Quantifizierung; gestrichelter Pfeil: möglicher Schritt

### 1.4.1 Relative und absolute Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird der Unterschied von Probe zu Probe oder zur Referenz betrachtet. Die absolute Menge an Probe oder Referenz ist dabei nicht bekannt. Bei der absoluten Quantifizierung hingegen wird die absolute Menge an Referenz durch ein anderes Messverfahren bestimmt. Dadurch kann bei der LC-MS-Messung ebenfalls die absolute Menge an Probe bestimmt werden. Die meisten der folgenden Verfahren werden normalerweise für die relative Quantifizierung verwendet. Bei der labelfreien Quantifizierung und den Verfahren iTRAQ und AQUA, siehe Abschnitte 1.4.2, 1.4.5 und 1.4.7, ist die absolute Quantifizierung der Probe durch die Zugabe genormter Standards möglich.

### 1.4.2 Labelfreie Quantifizierung

Die einfachste Form des Quantifizierens mittels Massenspektrometrie stellt das sogenannte labelfreie Quantifizieren dar. Dabei werden sowohl die Probe, als auch die Referenz in zwei getrennten LC-MS-Läufen hintereinander gemessen. Die Quantifizierung erfolgt durch das Quantifizieren der Peakflächen (*intensity based quantification*) oder durch das Zählen der MS/MS-Spektren (*spectral counting*) der Peptide eines Proteins. Das Quantifizieren über die Peakflächen erfolgt über das Erstellen eines *Extracted Ion-Chromatogrammes* (EIC) des entsprechenden Peptids in Referenz und Probe. Anschließend wird die Fläche des Peaks durch Integration ermittelt (*Area under curve* AUC) und das Verhältnis der Flächen von Referenz und Probe ermittelt (Bondarenko et al., 2002). Das Ergebnis der Messung hängt allerdings stark von der Reproduzier-

barkeit der gesamten Probenvorbereitung und der beiden LC-Läufe ab. Daher wird als alternative Methode zur Quantifizierung bei größeren proteomischen Ansätzen das Zählen von MS/MS-Spektren zur Quantifizierung verwendet (Gao et al., 2003; Liu et al., 2004). Dabei werden die MS/MS-Spektren, bei welchen eine Peptid-Identifikation über die Datenbanksuche möglich war, gezählt. Die so gewonnenen Daten werden anschließend über mathematische Methoden ausgewertet. Diese Methode zeigt eine hohe Korrelation der experimentellen Werte im Vergleich zum Quantifizieren über die Peakflächen sowohl beim labelfreien Quantifizieren (Old et al., 2005) als auch beim Quantifizieren mit Isotopenlabeling (Zybailov et al., 2005). Eine weitere Methode für die labelfreie absolute Quantifizierung ist die Bestimmung des *Exponentially modified* PAI ( $\text{emPAI} = 10^{\text{PAI}} - 1$ ) (Ishihama et al., 2005). Der *Protein abundance index* (PAI) ist als die Anzahl identifizierter Peptide dividiert durch die Anzahl theoretisch beobachtbarer tryptischer Peptide definiert (Rappsilber et al., 2002). Der emPAI kann dabei mit einer vorher absolut bestimmten Proteinmenge korreliert werden. Einen Überblick über das Themengebiet der labelfreien Quantifizierung bietet das Review von Zhu et al. (2010).

### 1.4.3 Quantifizierung mittels stabiler Isotope

Aufgrund der Probleme beim labelfreien Quantifizieren wurden verschiedene Methoden entwickelt, welche es möglich machen, zwei oder mehrere Proben gleichzeitig in einem LC-MS Lauf zu messen und zu quantifizieren. Dazu werden die verschiedenen Proben oder die Referenz durch eine Massendifferenz markiert (*Labeling*). Somit können sie im MS- oder MS<sup>2</sup>-Spektrum unterschieden und quantifiziert werden. Die verschiedenen Methoden unterscheiden sich darin, wann die Massenmarkierung bei der Probenvorbereitung eingebaut wird, und ob diese durch eine chemische Modifikation des Proteins/Peptids oder durch den Einbau von stabilen Isotopen bestimmter Elemente verursacht wird.

### 1.4.4 Metabolisches Labeling mit stabilen Isotopen

Beim Labeling von Proben mit stabilen Isotopen wird eine Probe mit Atomen versetzt, welche stabile Isotope der Elemente Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff oder Wasserstoff enthalten. Dabei werden jedoch bevorzugt Kohlenstoff, Sauerstoff und Stickstoff verwendet, da Deuterium bei der Flüssigkeitschromatographie zu einer Retentionszeitverschiebung führen kann. Die Methoden lassen sich weiter in metabolisches und chemisches Labeling unterscheiden. Beim metabolischen Labeling werden die schweren Isotope durch die Zugabe entsprechend isotope markierter Aminosäuren *in vivo* in die Probe integriert. Dies bietet den Vorteil, dass man die Proben direkt nach der Zellernte vereinen kann und sämtliche Aufbereitungsschritte für die Proben dann in einem Ansatz durchgeführt werden können. Schwankungen in der Quantifizierung, die durch Abweichungen in der Probenvorbereitung entstehen, werden so ausgeschlossen. Allerdings kann es sich als aufwendig und relativ kostenintensiv gestalten, diverse Organismen vollständig zu labeln.

### Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)

*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture* (SILAC) ist vermutlich die derzeit am häufigsten verwendete Methode des Labelings mit stabilen Isotopen. Zum Labeling werden den Zellen oder Organismen Nährstoffe zugeführt, welchen essentielle Aminosäuren wie zum Beispiel Arginin und Lysin fehlen. SILAC wird in dieser Form vor allem bei tierischen Zellen und Tieren angewendet, da diese die entsprechenden Aminosäuren nicht selbst synthetisieren können. Mittlerweile ist es gelungen, z.B. Mäuse vollständig durch eine entsprechende Diät mit der SILAC-Methode zu labeln (Kruger et al., 2008). Bei der einen Probe werden zusätzlich normales Arginin und Lysin hinzugegeben, bei der anderen Probe Arginin und Lysin, bei welchen die schweren stabilen Isotopen eingebaut sind. Erste Varianten von SILAC verwendeten dabei noch Deuterium (Ong et al., 2002). Bei neueren Varianten sind aufgrund der erwähnten Problematik mit Deuterium die Kohlenstoffatome von Arginin und Lysin durch 6  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoffatome ersetzt (Ong et al., 2003). Daneben besteht die Möglichkeit, zusätzlich die Stickstoffatome durch  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff zu ersetzen, so dass ein Massenunterschied von 10 Da pro Peptid entsteht. Nach diversen Zellteilungen bzw. Generationen sind die Proteine der einen Probe fast vollständig mit den schweren Varianten von Arginin und Lysin versehen. Der Proteinverdau findet anschließend mit Trypsin statt. Da dieses das Protein C-Terminal von Arginin und Lysin spaltet, hat jedes Peptid der schweren Variante im Vergleich zur leichten Variante einen Abstand von 6 Da beziehungsweise 10 Da, siehe Abbildung 1.11 auf der nächsten Seite. Dies vereinfacht die Datenanalyse im Vergleich zum  $^{15}\text{N}$ -Labeling erheblich. Problematisch bei SILAC ist jedoch die intrazelluläre Umwandlung von Arginin zu Prolin, was zu einer teilweisen Verschiebung des Labels führen kann. Dies kann jedoch durch Zugabe von Arginin mit 4  $^{15}\text{N}$ -Atomen zur leichten Probe ausgeglichen werden (Van Hoof et al., 2007). Eine weitere Variante von SILAC stellt Absolute SILAC dar. Dabei wird mittels metabolischem Labeling ein isotoopenmarkierter Proteinstandard erzeugt. Dieser wird dann der Probe vor den Aufreinigungsschritten hinzugegeben (Hanke et al., 2008). SILAC ist grundsätzlich auch bei Pflanzen möglich, wie von Gruhler et al. (2005) gezeigt wurde. Da diese jedoch alle Aminosäuren selbst synthetisieren können, kann der Einbau des Labels problematisch und damit die Labelingrate geringer sein. Weitere Informationen zu SILAC bietet die Literatur von Ong und Mann (2006); Mann (2006).

### $^{15}\text{N}$ -Labeling

Das Metabolische Labeling mit  $^{15}\text{N}$  folgt ähnlichen Prinzipien wie SILAC. Dabei werden bei der schweren Probe jedoch nicht nur bestimmte, sondern alle Aminosäuren mit  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff versehen, siehe Abbildung 1.12 auf der nächsten Seite. Dies bewirkt, dass die Massendifferenzen zwischen leichter und schwerer Probe je nach Peptidsequenz und -länge schwanken können, was die Datenauswertung erschwert. Weiter Informationen zum Thema  $^{15}\text{N}$ -Labeling finden sich in der Einleitung zu Kapitel 9 ab Seite 125 in dieser Arbeit.



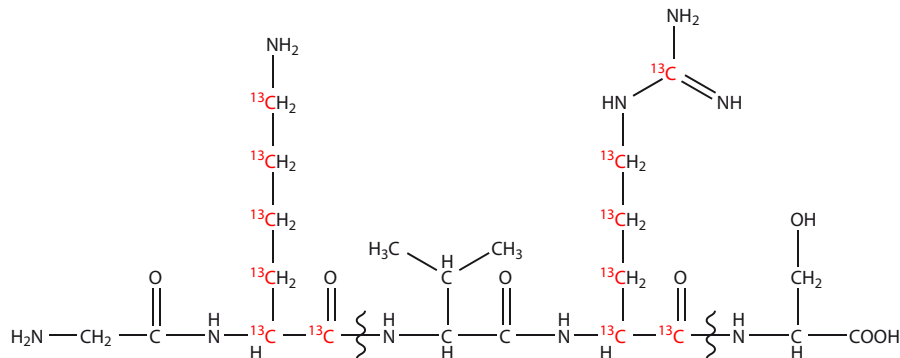


Abbildung 1.11 – SILAC-Labeling nach (Ong et al., 2003),  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff in der gelabelten Variante von Arginin und Lysin

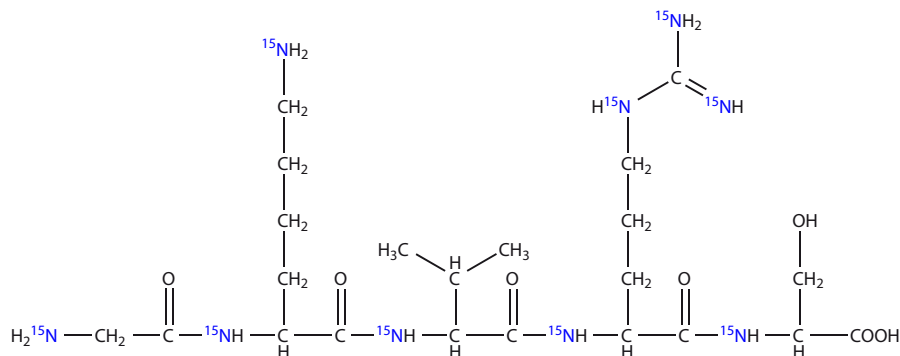


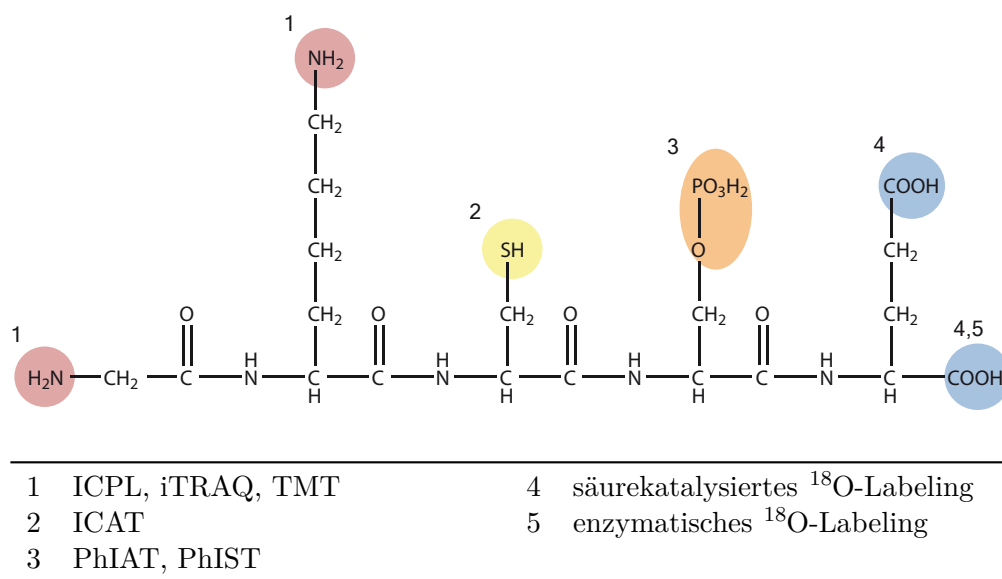
Abbildung 1.12 –  $^{15}\text{N}$ -Labeling,  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff in der gelabelten Variante des Peptids

### 1.4.5 Chemisches Labeling mit stabilen Isotopen

Neben den Methoden zum metabolischen Labeling existieren auch Varianten, welche Proteine nach der Aufreinigung und Peptide, während oder nach dem proteolytischen Verdau durch chemische und enzymatische Reaktionen, mit stabilen Isotopen markieren können. Die verschiedenen Methoden werden dazu zum Markieren bestimmter chemischer Gruppen verwendet, siehe Abbildung 1.13 auf der nächsten Seite.

#### Isotope-coded affinity tags (ICAT)

Beim Labeling mit *Isotope-coded affinity tags* werden die zu markierenden Proteine der verschiedenen Proben nach der Reduzierung einmal mit der leichten und einmal mit der schweren Variante des ICAT-Reagenz versetzt. Dieses besteht aus drei strukturellen Einheiten, welche zusammen die Markierung (*Tag*) bilden. An einem Ende des Moleküls befindet sich eine Iodacetamid-Gruppe welche spezifisch mit den reduzierten Thiolen der Aminosäure Cystein der Proteine reagiert. An diese knüpft ein Verbindungsstück aus 4,7,10-Trioxa-1,13-Tridecan-Diamin an, welches bei der leichten Variante unverändert ist, bei der schweren Variante hingegen 8 Deuterium Atome besitzt, siehe Abbildung 1.14

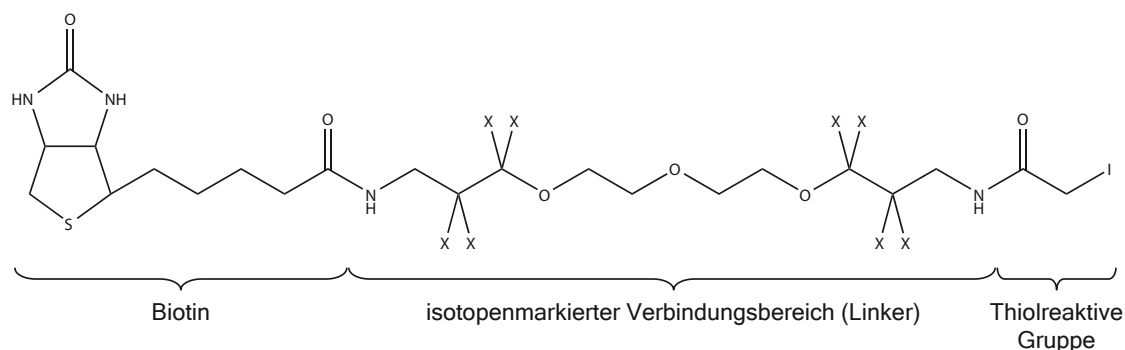


**Abbildung 1.13** – Ansatzpunkte verschiedener Methoden des chemischen Labelings mit stabilen Isotopen

auf Seite 17. An dieses schließt das Amid des Biotins an, welches für die Aufreinigung verwendet wird. Nach dem Labeling mit dem Reagenz werden die Proben kombiniert und enzymatisch verdaut. Bei den entstandenen Peptiden sind nun diejenigen, welche Cystein enthalten, markiert. Diese Peptide werden über eine Avidin-Affinitätschromatographie angereichert. Avidin ist ein Protein, welches 4 Biotine binden kann. Nach der Anreicherung werden die isolierten Peptide über LC-MS aufgetrennt und analysiert. Dabei kann man aufgrund des Massenunterschiedes zwischen der leichten und der schweren Variante des addierten Tags die beiden Proben relativ quantifizieren (Gygi et al., 1999). Da das ursprüngliche Reagenz durch Deuterium zu Retentionszeitverschiebungen führt und außerdem schlechtere Fragmentspektren der Peptide verursacht, wurden Reagenzien entwickelt, welche an Festphasen gekoppelt und photolytisch spaltbar sind (Zhou et al., 2002). Eine weitere Verbesserung stellt ein mit  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff gelabelter Marker dar, dessen Biotingruppe nach der Affinitätsaufreinigung abspaltbar ist (cICAT) (Hansen et al., 2003). Mit der Methode sind nur cysteinhaltige Peptide quantifizierbar.

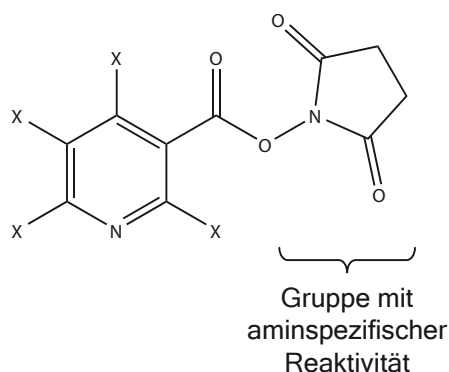
### Isotope-coded protein labels (ICPL)

Beim Labeling von Peptiden mit *Isotope-coded protein labels* werden diese mit Hilfe des N-Hydroxysuccinimid-Esters der Nicotinsäure an den Aminogruppen markiert. Bei der Nikotinsäure sind bei der schweren Variante des Tags die Wasserstoffatome durch Deuterium und bei der 4-Plex-Variante zusätzlich die Kohlenstoffatome durch  $^{13}\text{C}$ -Kohlenstoff ersetzt, siehe Abbildung 1.15 auf Seite 17. Die Quantifizierung erfolgt auf der Ebene des MS-Spektrums (Schmidt et al., 2005).



leichtes Reagenz	d0-ICAT (X=Protium)
schweres Reagenz	d8-ICAT (X=Deuterium)

**Abbildung 1.14** – Aufbau des ICAT-Massentags; Das Tag wird mit Hilfe der thiolreaktiven Gruppe an Cysteine addiert. Durch das unterschiedliche Labeling des Verbindungsbereiches wird die Massendifferenz des leichten und schweren Tags erzeugt, mit Hilfe der Biotin-Gruppe können die markierten Peptide selektiv angereichert werden.

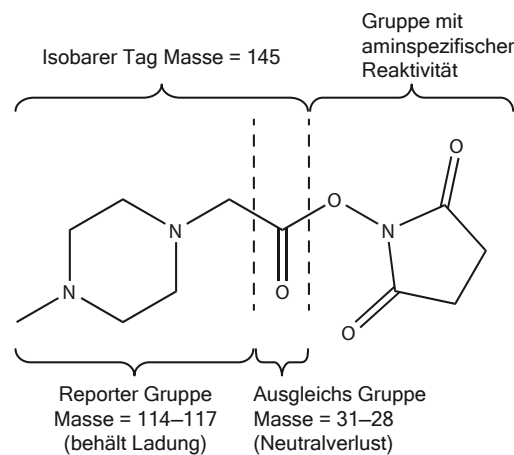


leichtes Reagenz	X=Protium
schweres Reagenz	X=Deuterium

**Abbildung 1.15** – Aufbau des ICPL-Massentags (2-plex); Bei der 4-plex-Variante sind zusätzlich die Kohlenstoff-Atome des Pyridin-Ringes isotopenmarkiert

## Isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)

Bei der *Isobaric tags for relative and absolute quantitation*-Methode (iTRAQ) werden isobare Tags verwendet, um die Peptide nach dem Verdau selektiv an den Aminogruppen N-Terminal und an Lysin zu labeln. Der Tag setzt sich bei dieser Methode aus zwei strukturellen Einheiten zusammen, siehe Abbildung 1.16 auf Seite 18. Für die Bildung des Amids mit der zu markierenden Aminogruppe wird ein N-Hydroxysuccinimid-ester der Essigsäure verwendet. N-Hydroxysuccinimid aktiviert dabei den Ester und fördert so die Amidierungsreaktion. Die Essigsäure ist wiederum an N-Methyl-Piperazin gekoppelt. Durch Kombination von  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - und  $^{18}\text{O}$ -Atomen des N,N-Dimethylpiperazin-Restes und der Carbonylfunktion werden isobare Tags geschaffen. Diese besitzen in der Summe die gleiche Masse, daher fallen die Massen der verschieden gelabelten Peptide im MS-Spektrum zusammen. Im MS<sup>2</sup>-Spektrum findet eine Spaltung zwischen der Carbonylgruppe (Ausgleichsgruppe) und der N,N-Dimethylpiperazin-Einheit (Reportergruppe) statt. Nach dieser Spaltung lassen sich dann die verschiedenen Reportergruppen auseinander halten und sich somit mit MS<sup>2</sup>-Spektrum quantifizieren (Ross et al., 2004). Die Methode besitzt den Vorteil, dass man 4 oder 8 Proben gleichzeitig quantifizieren



Reporter-Gruppe		Ausgleichs-Gruppe	
$m/z$ 114 (+1)	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$ $^{18}\text{O}$	(+3)
$m/z$ 115 (+2)	$^{13}\text{C}_2$	$^{18}\text{O}$	(+2)
$m/z$ 116 (+3)	$^{13}\text{C}_2$ $^{15}\text{N}$	$^{13}\text{C}$	(+1)
$m/z$ 117 (+4)	$^{13}\text{C}_3$ $^{15}\text{N}$		(+0)

**Abbildung 1.16** – Aufbau des iTRAQ-Massentags (4-plex); Nach Koppelung an Aminogruppen besitzen die Tags durch die in der Summe von Reporter- und Ausgleichsgruppe gleich vorhandenen schweren Isotope die gleiche Masse. Erst im Fragmentspektrum findet die Spaltung statt und die verschiedenen Proben lassen sich im Fragmentspektrum in der sogenannten Reporter-Region,  $m/z$ -Bereich (114–117), quantifizieren.

kann (4-plex und 8-plex) und sich die Fragmentspektren der einzelnen Proben bis auf die Reporterionen gleich verhalten. Im Gegensatz zu den anderen Quantifizierungsmethoden erfolgt die Quantifizierung im MS/MS-Spektrum. Dort finden sich dann im  $m/z$ -Bereich 114–117 die Reporterionen der verschiedenen Tags, welche quantifiziert werden. Allerdings ist gleichzeitig eine gute chromatographische Auftrennung erforderlich, da sonst Tags von anderen Peptiden in das MS<sup>2</sup>-Spektrum gelangen und die Quantifizierung verfälschen können.

### Tandem mass tags (TMT)

Die *Tandem mass tags*-Methode (TMT) ähnelt stark der iTRAQ-Methode. Auch hier werden eine Reportergruppe und eine Ausgleichsgruppe im Tag verwendet. In der ersten und zweiten Generation bestanden diese im Gegensatz zu iTRAQ aus deuteriumgelabelten Aminosäuren. Prolin zwischen der Reporter- und der Ausgleichsgruppe diente dabei als Fragmentierungsverstärker (Thompson et al., 2003). In der 6-Plex-Variante bestehen die Tags aus dem N-Hydroxysuccinimid-Ester der 3-Amino-n-Propansäure, welcher mit N-Acetyl-2,6-Dimethyl-Piperidin amidiert ist. Das N-Methyl-2,6-Dimethyl-Piperidin dient dabei als Reporter-Ion, die Säure als Massenausgleichsgruppe. Das Labeling findet dabei wie bei iTRAQ mit <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Atomen statt (Dayon et al., 2008). TMT und iTRAQ sind sich daher sehr ähnlich.

Die Tabelle 1.1 auf Seite 20 bietet eine Übersicht über die Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden des Labelings mit stabilen Isotopen.

### <sup>18</sup>O-Labeling

<sup>18</sup>O-Labeling wird zum Labeling von Peptiden während oder nach dem proteolytischen Verdau verwendet. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Varianten. Beim enzymkatalysierten <sup>18</sup>O-Labeling werden nur die beiden Sauerstoffatome der Carboxylgruppe am C-Terminus durch schwere Varianten ausgetauscht. Bei der säurekatalysierten Variante hingegen werden zusätzlich auch die Sauerstoffatome der Carboxylgruppen der Asparaginsäure und Glutaminsäure ausgetauscht, siehe Abbildung 1.13. Weitere Details zum <sup>18</sup>O-Labeling finden sich in der Einleitung von Kapitel 10 ab Seite 141.

### 1.4.6 Phosphorylierungsspezifisches Labeling

Neben den chemischen Labeling-Methoden für Amino- (iTRAQ, TMT), Carboxy- (<sup>18</sup>O) und Thiolgruppen (ICAT) existieren auch Labeling-Varianten, welche sich die Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation zunutze machen. So wurden von Weckwerth et al. (2000) Phosphopeptide nach dem Verdau und  $\beta$ -Eliminierung der Phosphatgruppe an Serin und Threonin durch 5 M NaOH (50 °C 3 h) mit Ethanthiol gelabelt. Bei der schweren Variante ist dabei der Ethanthiol mit 5 Deuterium Atomen markiert. Auf dieser Basis gibt es weitere Methoden für das phosphorylierungsspezifische Labeling,

SILAC <sup>TM</sup>	ICAT <sup>TM</sup>	iTRAQ <sup>TM</sup> & TMT <sup>TM</sup>	<sup>18</sup> O-labeling
Metabolisches Labeling Labeling an bestimmten Aminosäuren (Normalerweise Arginin und Lysin)	Chemisches Tagging Labeling an Cysteinen	Chemisches Tagging Labeling am Peptid N-Terminus und an Lysin Seitenketten	Enzymatisches Labeling Labeling am Peptid C-Terminus
Labeling während des Zellwachstums	Labeling erfolgt vor dem Proteinverdau	Labeling erfolgt nach dem Proteinverdau	Labeling erfolgt während des Proteinverdaus
Labeling auf Proteinebene	Labeling auf Proteinebene	Labeling auf Peptidebene	Labeling auf Peptidebene
Chemisches Labeling Labeling am Peptid C-Terminus und Asparaginsäure, Glutaminsäure			
Labeling erfolgt nach dem Proteinverdau			
Labeling auf Peptidebene			

Vorteile und Nachteile

Einheitliches Labeling jedes Proteins	Nur Cysteinhaltige Peptide werden gelabelt	Alle Peptide werden gelabelt	Alle Peptide werden gelabelt	Alle Peptide werden gelabelt
Keine Reduzierung der Probenkomplexität	Reduzierung der Probenkomplexität	Keine Reduzierung der Probenkomplexität	Keine Reduzierung der Probenkomplexität	Keine Reduzierung der Probenkomplexität
Nicht direkt anwendbar auf Blut- und Gewebe-Proben	Keine Probenbeschränkung	Keine Probenbeschränkung	Keine Probenbeschränkung	Keine Probenbeschränkung
Mischen der unterschiedlich behandelten Proben auf Ebene der intakten Zellen	Mischen der unterschiedlich behandelten Proben auf Proteinebene	Mischen der unterschiedlich behandelten Proben auf Peptidebene	Mischen der unterschiedlich behandelten Proben auf Peptidebene	Mischen der unterschiedlich behandelten Proben auf Peptidebene
Umwandlung von Arginin zu Prolin	Nebenreaktionen mit Methioninen	Nebenreaktionen mit Thiolen und primären Aminen	Keine Nebenreaktionen	Nebenreaktionen C-terminal von Threonin und Serin, partielle Hydrolyse

MS Quantifizierung	MS Quantifizierung	MS/MS Quantifizierung	MS Quantifizierung
--------------------	--------------------	-----------------------	--------------------

**Tabelle 1.1** – Vergleich der Quantitativen Methoden des Labeling mit Stablen Isotopen nach Capelo et al. (2010)

welche auch Anleihen bei ICAT nehmen. Die *Phosphoprotein isotope-coded affinity tag*-Methode (PhIAT) verwendet ebenfalls die  $\beta$ -Eliminierung durch NaOH mit anschließender Addition eines Thiols. Allerdings wird dabei Ethan-1,2-Dithiol in ungelabelter und deuterium-markierter Variante verwendet. An die freie Thiol-Gruppe wird anschließend (+)-Biotinyl-Iodoacetamid-3,6-Dioxaoctandiamin gekoppelt, welches wie bei ICAT zur Avidin-Anreicherung verwendet wird (Goshe et al., 2001). Die *Phosphoprotein isotope-coded solid-phase tag*-Methode (PhIST) stellt eine Erweiterung der PhIAT-Methode dar. Sie ist dabei an die Festphasen-ICAT-Methode von Zhou et al. (2002) angelehnt. An Phosphoserine und -threonine wird dabei nach der  $\beta$ -Eliminierung Ethan-1,2-Dithiol addiert. Die freie Thiolgruppe wird anschließend mit dem Reagenz der Festphasen-ICAT-Methode gekoppelt (Qian et al., 2003).

### 1.4.7 Absolute Quantifizierung mit Peptidstandards (AQUA)

Ein Konzept für die Quantifizierung biogener Peptide mittels Peptidstandards wurde erstmals von Desiderio und Kai (1983) mit  $^{18}\text{O}$ -gelabelten Peptiden und Detektion mittels Feld-Desorptions-Massenspektrometrie angewendet. Für die Quantifizierung von Proteinen wurde durch Barnidge et al. (2003) eine Methode mit deuterium-markierten Peptiden und einer Quantifizierung durch *Multiple reaction monitoring* mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer verwendet.

Der heute zumeist verwendete Ansatz wurde von Gerber et al. (2003) publiziert. Dabei werden mit den stabilen Isotopen  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -gelabelte synthetische tryptische Peptide für die Quantifizierung von posttranslational modifizierten und unmodifizierten Proteinen verwendet. Zuerst werden aus dem zu quantifizierenden Protein nach Trypsinverdau und LC-MS/MS Messung oder durch *in silico* Verdau geeignete Peptidkandidaten identifiziert. Diese Peptide werden anschließend synthetisiert, wobei eine Aminosäure mit den schweren Isotopen markiert ist (AQUA-Peptid). Von diesem Peptid wird auch die Stoffmenge mittels Aminosäureanalyse (Cohen und Strydom, 1988) ermittelt. Ausgehend von den MS<sup>2</sup>-Spektren der Peptide werden im folgenden MRM-Übergänge für die intensivsten Fragmentionen von dem ungelabelten und gelabelten Peptid definiert. Für das eigentliche Experiment werden die Proteine nach der Zellernte und der Aufreinigung mittels SDS-PAGE vor dem tryptischen Verdau mit dem AQUA-Peptid versetzt. Die Peptidmischung wird anschließend mit der MRM-Methode am Triple-Quadrupol-Massenspektrometer gemessen. Dabei werden die gleichen Übergänge von leichtem und schwerem Peptid miteinander verglichen. Da die Stoffmenge an synthetischen Peptid bekannt ist, kann man anschließend über die Integration der Peakflächen die absolute Menge an gemessenem Proben-Peptid und damit auch an Proben-Protein ermitteln.

### 1.4.8 Quantifizierung mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Einen Spezialfall stellt die absolute Quantifizierung mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*Inductively coupled plasma mass spectrometry* ICP-MS) dar. Dabei handelt es sich um Sektorfeld- oder Quadrupol-Massenspektrometer, welche

## 1 Einleitung

eine Ionenquelle besitzen, in der Argon-Gas induktiv bis zum Plasmazustand erhitzt wird. In dieses werden die Analyten per LC injiziert. Dabei werden diese pyrolytisch in ihre Atome gespalten und diese ionisiert. Dadurch lassen sich bestimmte Atome wie zum Beispiel Schwefel oder Phosphor gezielt messen. Dies ermöglicht durch Referenzlösungen der Elemente eine absolute Quantifizierung dieser Atome. Die Signalintensität im ICP-MS hängt dabei direkt von der absoluten Menge des Elementes ab und wird nicht durch die Struktur des Analyten beeinflusst, wie es bei der ESI-MS von Peptiden der Fall ist. Somit bietet die ICP-MS die Möglichkeit, Peptide und Proteine über den enthaltenen Schwefel absolut zu quantifizieren. Bei der Analyse von  $^{31}\text{P}$ -Phosphor (Wind et al., 2001a; Becker et al., 2003) und  $^{32}\text{S}$ -Schwefel (Wind et al., 2001b) kann es allerdings zu isobaren Interferenzen mit Stickoxiden kommen. Diese Interferenzen machen bei der ICP-MS-Analyse dieser Elemente die Verwendung eines hochauflösenden Massenanalysators notwendig. Da bei der Pyrolyse die Peptide zerstört werden und damit auch deren Sequenzinformationen verloren gehen, wird die Analyse mittels ICP-MS oftmals mit der Analyse eines Tandemmassenspektrometers kombiniert. Dies kann zum Beispiel über eine gemeinsame Flüssigchromatografie und eine Aufteilung der Analyten auf beide Massenspektrometer oder durch Messung einer Gelbande aus einer SDS-PAGE mit den verschiedenen Methoden erfolgen.

### Metal-coded affinity tag (MeCAT)

*Metal-coded affinity tags* kombinieren das Labeling von thiolhaltigen Gruppen an Cysteinen mit der Möglichkeit, Metallionen selektiv am ICP-MS zu messen. Das Massentag besteht dabei aus einer thioispezifischen Gruppe, einem Abstandstück und 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure als Chelatkomplexbildner für dreiwertige Lanthanid-Ionen, siehe Abbildung 1.17 auf der nächsten Seite. Bei Verwendung diverser Lanthanidmetalle bei der Chelatierung ist es somit möglich, Tags mit unterschiedlichen Massen zu erzeugen (Whetstone et al., 2004). Durch den Einsatz dieser unterschiedlichen Tags können unterschiedliche Proben im ICP-MS nebeneinander absolut quantifiziert werden (Ahrends et al., 2007). Die Vorteile bei der Quantifizierung über Lanthanidmetalle liegen dabei in einer besseren Empfindlichkeit bei der Analyse, welche aufgrund eines niedrigeren Hintergrundrauschens durch die geringe natürliche Konzentration an Lanthanoiden im Vergleich zu Schwefel und Phosphor zustande kommt. Neuere Varianten des Tags verwenden aufgrund weniger Nebenreaktionen ein Iodessigsäureamid als thioispezifische Gruppe (Schwarz et al., 2011).

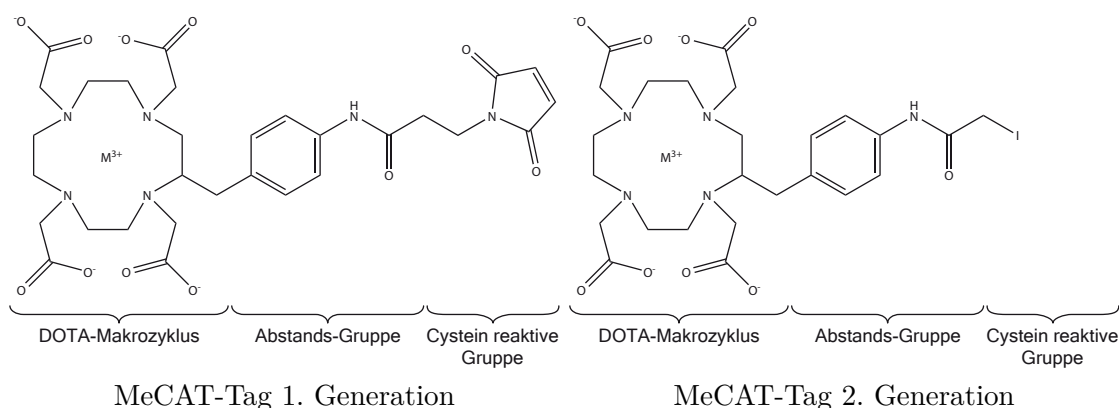
Einen Überblick über die Quantifizierung von Proteinen mittels ICP-MS bieten die Reviews von Sanz-Medel (2010) und Wang et al. (2010).

## 1.5 Phosphorylierung von Proteinen

### 1.5.1 Vorkommen und biologische Bedeutung

Als posttranslationale Modifikationen (PTM) werden alle kovalenten Modifizierungen von Proteinen nach ihrer Proteinbiosynthese in der Zelle bezeichnet. Eine wichtige Grup-





**Abbildung 1.17** – Aufbau des MeCAT-Massentags; Die MeCAT-Massentags besitzen einen Makrozyklus als Chelatbildner für die Bindung von Lanthanid-Metallionen, welche als Label für die jeweilige Probe dienen. Dieser Makrozyklus ist über eine Abstandsgruppe mit einer reaktiven Gruppe mit Thiol-spezifität verbunden. An dieser findet die Kopplung mit Cystein statt. MeCAT-Reagenzien der 2. Generation besitzen hierbei eine Iodacetamid-Gruppe, welche weniger Nebenreaktionen verursacht als die Maleimido-Gruppe der ersten Generation des Tags.

pe stellt dabei das reversible Hinzufügen von funktionellen Gruppen an bestimmte Aminosäuren dar. Dies umfasst neben der Phosphorylierung auch Modifikationen wie Acetylierung, Formylierung, Glykosylierung, Methylierung, Ubiquitinierung sowie weitere Modifikationen. Unter den genannten Modifikationen stellt die Phosphorylierung nach bisherigen Erkenntnissen die Häufigste dar. So wurden im Verlauf der Sequenzierung des humanen Genoms 518 Gene für Proteinkinasen (Manning et al., 2002) und für 214 Proteinphosphatasen (Mueller et al., 2007) entdeckt. Es wird angenommen, dass im zellulären Proteom mehr als 500 000 Phosphorylierungsstellen existieren (Lemeer und Heck, 2009). Die Proteinphosphorylierung dient dabei der Signalisierung vieler verschiedener Zellprozesse wie zum Beispiel der interzellulären Kommunikation, dem Zellwachstum, der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose (Hunter, 2000; Blume-Jensen und Hunter, 2001). Auch für die Funktionsweise der circadianen Uhr ist die Proteinphosphorylierung von entscheidender Bedeutung, siehe Abschnitt 1.6.

Die Phosphorylierung kann dabei verschiedene Eigenschaften eines Proteins wie zum Beispiel die Proteinfaltung, seine enzymatische Aktivität, die Lokalisierung in der Zelle oder seinen Abbau von Bedeutung sein. Fehlfunktionen bei der Proteinphosphorylierung können daher zur Entstehung verschiedener Krankheiten wie Krebs oder Diabetes führen (Clevenger, 2004). Obwohl angenommen wird, dass mehr als 30–50 % aller Proteine zu einem Zeitpunkt ihrer Existenz phosphoryliert sind (Hubbard und Cohen, 1993; Cohen, 2002), kann das Verhältnis von phosphorylierter zu nicht phosphorylierter Proteinspezies erheblich schwanken (Hunter, 1995). Für die Analyse ist daher in der Regel ein spezifischer Anreicherungsschritt der Phosphorylierung notwendig, siehe Kapitel 4 (ab Seite 45).

## 1 Einleitung

Bislang sind vier Typen von Proteinphosphorylierungen bekannt: O-Phosphate, welche durch die Phosphorylierung der Hydroxygruppen der Seitenketten an Serin, Threonin und Tyrosin gebildet werden; N-Phosphate, welche an den Aminogruppen der Seitenketten von Arginin, Lysin und Histidin gebildet werden; O-Acylphosphate, welche durch die Phosphorylierung von Aspartamsäure und Glutaminsäure entstehen und S-Acylphosphate, welche durch die Phosphorylierung von Cystein entstehen. Die verschiedenen Phosphorylierungsspezies unterscheiden sich dabei erheblich in ihrer Stabilität. So sind nur die O-Phosphate unter sauren Bedingungen, wie sie zum Beispiel bei LC-MS-Analyse vorliegen, stabil (Martensen, 1984).

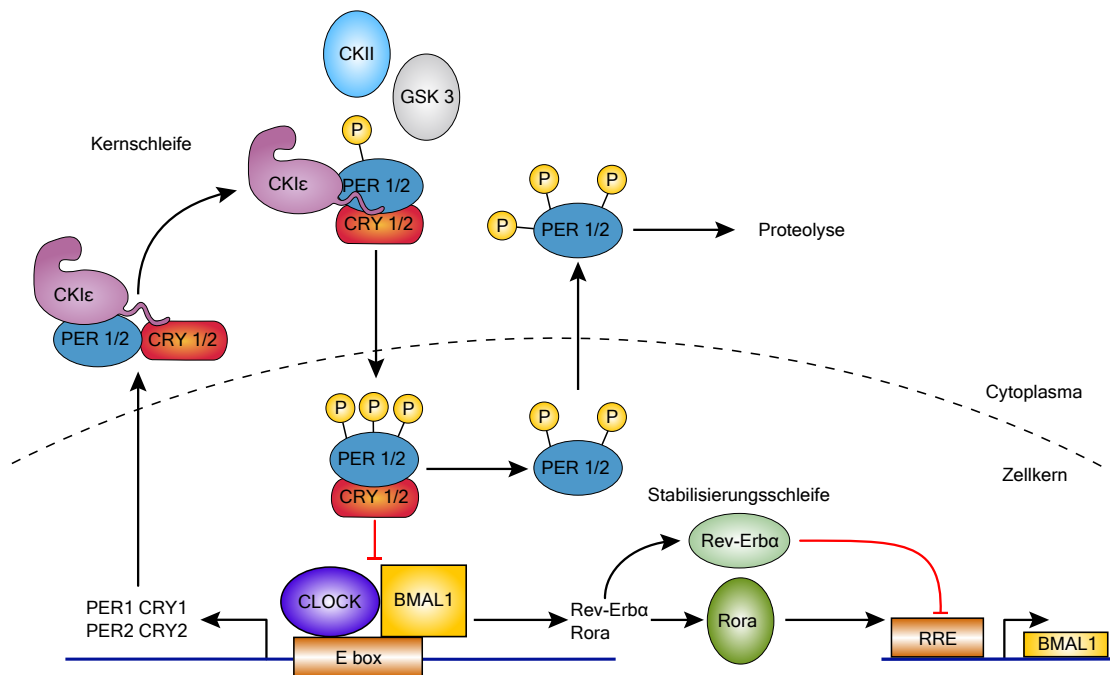
Trotz der geringeren Stabilität der Histidinphosphorylierung ist deren Analyse mittels LC-MS ebenfalls möglich (Wind et al., 2005). Routinemäßig werden allerdings bislang nur O-Phosphorylierungen an Proteinen mittels LC-MS untersucht.

### 1.5.2 Qualitative Analyse der Proteinphosphorylierung

Es existieren verschiedene Methoden zur Analyse der Phosphorylierung von Proteinen. Zum einen wird dafür das Labeling mit radioaktivem  $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$ -Phosphor und die Analyse der Proteine mittels Western-Blot verwendet. Bei der Analyse durch Labeling mit radioaktivem Phosphor wird Zellen *in vivo* Adenosintriphosphat mit  $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$ -Phosphor zugegeben. Dieser Phosphor markiert die Phosphorylierungsstellen. Bei der Analyse der Phosphorylierung mit  $^{32}\text{P}/^{33}\text{P}$ -Phosphor besteht allerdings die Gefahr, dass sich das Phosphoproteom der Zellen durch die Strahlenbelastung verändert. Nach der Proteinanreicherung, dem proteolytischen Verdau und einer HPLC-Analyse mit Fraktionssammler, lässt sich die radioaktive Peptidfraktion identifizieren. Diese wird anschließend über einen Edman-Abbau identifiziert. Außerdem kann die Analyse von Phosphoproteinen mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern in Kombination mit Western-Blotting erfolgen. Dabei ist die Selektivität der Antikörper für Phosphotyrosin jedoch wesentlich höher als die für Phosphoserin und -threonin. Außerdem lässt sich bei den beiden Methoden die Phosphorylierung nicht direkt lokalisieren. In den vergangenen Jahren hat die Analyse von Phosphoproteinen mittels LC-MS stark an Bedeutung gewonnen, da sie unter anderem auch genauere Informationen zur Lokalisation der Phosphorylierung bietet. Methoden zur Analyse der Proteinphosphorylierung mittels LC-MS sind in Abschnitt 6.1.1 ab Seite 63 beschrieben.

## 1.6 Die circadiane Uhr bei Säugetieren

Circadiane Rhythmen wie zum Beispiel der Schlaf-Wach-Zyklus werden bei Säugetieren durch ein molekulares Zeitgebersystem gesteuert. Das Zeitgebersystem besteht dabei aus verschiedenen Proteinen und Kinasen, durch deren Zusammenspiel aus Proteinexpression und Phosphorylierung der Rhythmus des Systems entsteht. Bei Säugetieren ist das System zudem hierarchisch organisiert, wobei eine Master-Uhr im Suprachiasmatischen Nukleus (SCN) im Hypothalamus durch neuronale und hormonelle Signale die peripheren Uhrsysteme reguliert.



**Abbildung 1.18** – Schematischer Aufbau der circadianen Uhr bei Säugetieren nach Gallego und Virshup (2007) (modifiziert): negative Feedbackschleife über mCRY1/2 und mPER1/2; positive Feedbackschleife über Rev-Erb $\alpha$  und Rora

Bislang bekannte molekulare Komponenten dieses Systems bei Säugetieren stellen dabei die Proteine mPER1 (Sun et al., 1997; Tei et al., 1997), mPER2 (Shearman et al., 1997), mPER3 (Zylka et al., 1998; Takumi et al., 1998), mCRY1, mCRY2 (Kume et al., 1999), REV-ERB $\alpha$  und Rora (Sato et al., 2004), die Kinasen CKI $\alpha$  (Hirota et al., 2010), CKI $\epsilon$  (Keesler et al., 2000; Akashi et al., 2002), CKI $\delta$  (Camacho et al., 2001; Akashi et al., 2002), CK2 (Tsuchiya et al., 2009) und GSK3 (Iitaka et al., 2005), die Phosphatasen PP1 (Yang et al., 2004; Gallego et al., 2006; Schmutz et al., 2011) und PP5 (Partch et al., 2006), die Transkriptionsfaktoren CLOCK, BMAL1 (Gekakis et al., 1998) und NPAS2 (Reick et al., 2001; DeBruyne et al., 2007) und F-Box Proteine  $\beta$ -TRCP1 und  $\beta$ -TRCP2 (Shirogane et al., 2005) dar. Das kleine m vor der Proteinbezeichnung steht für die Herkunft der Proteine von Organismen der Klasse der Säugetiere (*Mammalia*).

Diese Proteine wirken dabei in positiven und negativen Rückkopplungsschleifen zusammen, wie in Abbildung 1.18 auf Seite 25 zu sehen ist. Bei *Drosophila* und *Neurospora* wurde auch PP2A (Yang et al., 2004; Sathyanarayanan et al., 2004) als Komponente der circadianen Uhr identifiziert. Zum einen existiert eine positive Rückkopplungsschleife, welche bei steigender Inhibition des Transkriptionsfaktordimers von CLOCK und BMAL1 verzögert die Expression von BMAL1 aktiviert (Preitner et al., 2002; Ueda et al., 2002). Dies bewirkt, dass die RNA Level von mPER und mCRY mit denen von BMAL1 zwölf Stunden außer Phase liegen (Shearman et al., 2000; Oishi et al., 2000).

## 1 Einleitung

Die Hauptkomponente der circadianen Uhr besteht aus einer negativen Rückkopplungsschleife. Das Heterodimer aus den Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 aktiviert dabei die rhythmische Transkription der drei Period-Gene und der zwei Cryptochrom-Gene. Die daraus entstandenen Period- und Cryptochrom-Proteine (mPER und mCRY) wandern nach der Bildung eines Komplexes in den Zellkern (Kume et al., 1999) und inhibieren durch direkte Interaktion mit dem Transkriptionsfaktordimer ihre eigene Transkription.

mPER2 wird dabei unter den Period-Proteinen die größte Bedeutung für die Funktion des circadianen Rhythmus beigemessen, da die Deletion des entsprechenden Gens zu Arrhythmien der circadianen Uhr führt, während die Deletion des mPER1-Gens nur eine Verkürzung der Periodendauer bewirkt. Die Deletion von mPER3 hat hingegen kaum Einfluss auf die normale Funktionsweise (Bae et al., 2001; Zheng et al., 2001).

Die Phosphorylierung ist dabei für die korrekte Funktion der negativen Rückkopplungsschleife von großer Bedeutung. Da normale Translations-Transkriptions-Rückkopplungsschleifen nur Zyklusdauern von einigen Stunden besitzen, macht erst die Regulation der Schleife über die Phosphorylierung eine Zyklusdauer der circadianen Uhr von ungefähr 24 Stunden möglich.

Dabei wird nach aktuellem Stand der Forschung vermutlich sowohl die Bildung der Komplexe von mPER, mCRY, CLOCK und BMAL1 (Lee et al., 2001), der Transport der Proteine in und aus dem Zellkern als auch der Abbau der Proteine durch die Phosphorylierung reguliert. So wurde für mPER1 durch Keesler et al. (2000) und für mPER2 durch Eide et al. (2005) gezeigt, dass diese nach Phosphorylierung durch CKI $\epsilon$  beziehungsweise CKI $\delta$  (Camacho et al., 2001) und anschließender Ubiquitinierung unter Beteiligung von F-Box-Proteinen (Shirogane et al., 2005) durch das Proteasom abgebaut werden. Die Bindung von mPER2 an mCRY behindert hingegen die Ubiquitinierung beider Proteine (Yagita et al., 2002).

Bei mPER2 wurden bislang verschiedene Bindungsregionen, Motive und Domänen für die Interaktion mit CKI $\epsilon$ , mCRY und für den Transport in und aus dem Zellkern lokalisiert, siehe Abbildung 1.19 auf der nächsten Seite. Ähnliche Bindungsregionen, Motive und Domänen wurden auch bei mPER1 und mPER3 identifiziert. Die Datenlage in Bezug auf die Funktion der einzelnen Motive ist jedoch nicht in allen Fällen eindeutig.

Durch Vanselow et al. (2006) wurden bei mPER2 im Bereich der CKI $\epsilon$ -Bindungsdomäne (Akashi et al., 2002) als auch im Bereich eines der drei *Nuclear export signal*-Motive (NES) (Yagita et al., 2002) Phosphorylierungen identifiziert. Die NES-Motive sind dabei für den Export der Period-Proteine aus dem Zellkern von Bedeutung (Vielhaber et al., 2001; Yagita et al., 2002). Phosphorylierungen in der Nähe von NES-Motiven können diese inaktivieren, wie durch Yang et al. (1998) am Beispiel von Cyclin B gezeigt wurde. Eine Phosphorylierung in der Nähe eines *Nuclear localisation signal*-Motives (NLS) führte beim Adenomatous-Polyposis-Coli-Protein ebenfalls zu einer negativen Regulierung dieses NLS (Zhang et al., 2000). Im Fall von mPER2 wurde gezeigt, dass der NLS für die vollständige Lokalisierung des mPER2-mCRY1-Komplexes im Zellkern benötigt wird (Miyazaki et al., 2001). Auch bei mPER1 regulieren vermutlich Phosphorylierungen in der Nähe des NLS den Transport des Proteins in den Zellkern (Vielhaber et al.,

1	MNGYVDFSPS	PTSPTKEPGA	PQPTQAVLQE	DVDMSSGSSG	NENCSTGRDS
51	QGSDCDDNGK	ELRMLVESSN	THPSPDDAFR	LMMTEAEHNP	STSGCSSEQS
101	AKADAHKELI	RTLKELKVHL	PADKKAKGKA	STLATLKYAL	RSVKQVKANE
151	EYYQLLMSSE	SQPCSVDVPS	YSMEQVEGIT	SEYIVKNADM	FAVAVSLVSG
201	KILYISNQVA	SIFHCKKDAF	SDAKFVEFLA	PHDVSVFHSY	TPYKLPWWS
251	VCSGLDSFTQ	ECMEKSFFC	RVSVGKHEN	EIRYQPFMT	PYLKVKVEQQ
301	GAESQLCCLL	LAERVHSGYE	APRIPPEKRI	FTTHTPNCL	FQAVDERAVP
351	LLGYLPQDLI	ETPVLVQLHP	SDRPLMLAIH	KKILQAGGQP	FDYSPIRFRT
401	RNGEYITLDT	SWSSFNPWS	RKISFIIGRH	KVRVGPLNED	VFAASPCPEE
451	KTPHPVQEL	TEQIHRLLMQ	PVPHSGSSGY	GSLGSNGSHE	HLMSQTSSSD
501	SNGQEESHRR	RSQIFKTSQK	IQTKSHVSHE	SGGQKEASVA	EMQSSPPAQV
551	KAVTTIERDS	SGASLPKASF	PEELAYKNQP	PCSYQQISCL	DSVIRYLESC
601	SEAAATLKRKC	EFPANIPSRK	ATVSPGLHSG	EAARPSKVT	HTEVSAHLSS
651	LTLPQKAESV	VSLTSQCSYS	STIVHVGDKK	PQPELETVED	MASGPESLDG
701	AAGGLSQEKG	PLQKLGLTKE	VLAHTQREE	QGFLQRFREV	SRLSALQAHC
751	QNYLQERSRA	QASDRGLRNT	SGLESSWKKT	GKNRKLKSKR	VKTRDSSEST
801	GSGGPVSHRP	PLMGLNATAW	SPSDTSQSSC	PSAPFPTAVP	AYPLPVFQAP
851	GIVSTPGTVV	APPAATHTGF	TMPVVPMTQ	PEFAVQPLPF	AAPLAPVMAF
901	MLPSYPFPPA	TPNLPQAFLP	SQPHFPAHPT	LASEITPASQ	AEFPRSSTL
951	RQPCACPVTP	PAGTVALGRA	SPPLFQSRGS	SPQLQLNLLQL	EEAPEGSTGA
1001	AGTLGTGTGA	ASGLDCTSGT	SRDRQPKAPP	TCNEPSDTQN	SDAISTSSDL
1051	LNLLGEDLC	SATGSALSRS	GASATSDSLG	SSSLGFGTSQ	SGAGSSDTS
1101	TSKYFGSIDS	SENNHKAKMI	PDTEESEQFI	KYVLQDPIWL	LMANTDDSIM
1151	MTYQLPSRDL	QAVLKEDQEK	LKLLQRSQPR	FTEGQRRELRL	EVHPVWHTGG
1201	LPTAIDVTGC	VYCESEEKGN	ICLPYEEDSP	SPGLCDTSEA	KEEEGEQLTG
1251	PRIEAQTKGG	RADPAFLYKV	VDLEGPRFEG	KPIPNNLLGL	DSTRTGHHHH
1301	HH				

- ▶ NES Motive 1,2,3
- ▶ PAS Domänen 1,2
- ▶ PAC Domäne
- ▶ CKIε Bindungsdomäne
- ▶ mCRY Bindungsdomäne
- ▶ NLS Motiv
- ▶ β-TRCP1 Interaktionsmotive

Abbildung 1.19 – Bekannte Bindungsregionen und Domänen von mPER2

## 1 Einleitung

2000). Für den circadianen Rhythmus ist dabei auch das Verhältnis zwischen Kinase und Phosphatase von Bedeutung (Lee et al., 2011). Die genauen Mechanismen des Zusammenspiels der verschiedenen Proteine sind hingegen jedoch noch unbekannt.

Einflüsse, welche den Phosphorylierungsstatus von mPER2 verändern, haben daher eine große Auswirkung auf die Zyklusdauer des circadianen Rhythmus. Dies ist zum Beispiel beim *Familial advanced sleep-phase syndrome* (FASPS) der Fall, welches durch eine Punktmutation des Serins an Position 662 von hPER2 verursacht wird. Bei Patienten mit FASPS ist diese Aminosäure durch ein Glycin ausgetauscht, welches in einer Domäne liegt, die durch CK1 $\epsilon$  phosphoryliert wird (Toh et al., 2001). Da die Phosphorylierung in diesem Bereich PER2 stabilisiert (Vanselow et al., 2006), bewirkt die Hypophosphorylierung einen schnelleren Abbau von PER2 und damit einer verkürzten Periode des circadianen Rhythmus. Eine andere Variante des FASPS wird durch eine Mutation an CK1 $\delta$  ausgelöst, welche ebenfalls in einer geringen Phosphorylierung von PER2 resultiert (Xu et al., 2005). Diese Veränderungen bewirken bei den betroffenen Personen eine Verschiebung des Wach-Schlaf-Zyklus um ungefähr vier Stunden nach vorne.

Ebenso finden sich beim *Delayed sleep-phase syndrom* (DSPS) Hinweise auf einen Aminosäureaustausch von Valin 647 durch Glycin (Ebisawa et al., 2001). Allerdings konnten bei DSPS und beim *Non-24-hour sleep-wake syndrome* (N-24), bei welchem sich die Schlafphasen fortlaufend verschieben, noch keine eindeutigen Auslöser ermittelt werden (Ebisawa, 2007).

Einen detaillierteren Überblick über den molekularen Mechanismus der circadianen Uhr bei Säugetieren bieten die Reviews von Vanselow und Kramer (2010), Gallego und Virshup (2007) und Reppert und Weaver (2002).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Nach bisherigen Erkenntnissen (vergl. Abschnitt 1.6 der Einleitung) spielt die Phosphorylierung eine zentrale Rolle für die Funktionsweise des circadianen Systems bei Säugtieren. Ziel dieser Arbeit war es daher, qualitativ möglichst alle Phosphorylierungen an den Proteinen mPER1 und mPER2 zu erfassen bzw. bestehende Analytische Methoden für solch eine Erfassung zu verbessern.

Nach der qualitativen Analyse der Phosphorylierungsstellen an den PER-Proteinen sollte die quantitative Analyse der Phosphorylierung in den Mittelpunkt rücken, um für die Funktion des circadianen Systems relevante Phosphorylierungsstellen an den Proteinen zu identifizieren. Für den ersten Teil der Arbeit stand dabei die Optimierung einer  $\text{TiO}_2$ -basierten Phosphopeptidanreicherung kombiniert mit einem Verdau durch verschiedene Proteasen und die Messung an CID- und ETD Massenspektrometern im Vordergrund. Für die quantitativen Messungen sollten verschiedene Quantifizierungsstrategien für die Messungen an den PER-Proteinen untersucht und schließlich auf diese angewandt werden. Zielsetzung war dabei die quantitative Messung an einem arbeitenden circadianen System.





## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel stammen, soweit nicht anders angegeben, von Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Acetonitril (ACN) wurde in der Qualität LC-MS-Grade von der Firma LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland) bezogen.

### 3.2 Proteine und Peptide

Als Standardprotein für Versuche an Phosphoproteinen wurde cAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Alpha (PKA) (Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Germany) verwendet. Als Standardpeptide wurden unphosphorylierte und phosphorylierte AQUA-Peptide der Firma Sigma Aldrich verwendet. Außerdem kamen Glu-Fib von Sigma Aldrich (St. Louis, USA), ein Phosphopeptid-Mix (Peptidmix A & B) (AG Volkmer, Institut für medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin) und ein mehrfach phosphorylierter Phosphopeptid-Mix (7P-Mix) (AG Lehmann, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) zum Einsatz. Als Peptidmischung wurde zudem der „*Protein Mixture Digest (lyophilized)*“ (Dionex-Mix) P/N 161088 der Firma Dionex (mittlerweile Thermo Fisher Scientific, Walton, MA, USA) verwendet, welcher Cytochrome C (Rind), Lysozyme (Huhn), Alcohol dehydrogenase (Hefe), Bovine serum albumin (Rind), Apo-Transferrin (Rind) und  $\beta$ -Galactosidase (E.Coli) enthält.

### 3.3 Enzyme

Als Protease für den Verdau der Proteine fanden die Enzyme Trypsin (Promega Corporation, Madison, WI, USA), Thermolysin (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), Elastase (Roche Diganostics GmbH, Mannheim, Deutschland und MP Biomedicals, Solon, OH, USA) sowie Chymotrypsin (Promega Corporation, Madison, WI, USA) Verwendung.

### 3.4 Präparation der mPER-Proteine aus HEK293-Zellen

Die Präparation der mPER-Proteine aus HEK293-Zellen wurde von Sabrina Wendt, Astrid Grudziecki und Jens Vanselow (AG Kramer, Institut für Medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin) durchgeführt.

### 3 Material und Methoden

Für eine Immunopräzipitation, entsprechend dem Material für 3 Banden für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), wurden dazu 10 konfluente 175er Flaschen der stabilen HEK293/Per2-V5-Zelllinie expandiert. Das murine mPER1 und mPER2 ist dabei in der Zelllinie überexprimiert und nicht Bestandteil eines funktionierenden circadianen Systems.

#### 3.4.1 Zellernte

Die Zellen pro Zellkulturschale wurden einmal mit je 10 ml eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen, vollständig abgenommen und dann 2–3 ml eiskalter Co-IP-Lysispuffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 140 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM TCEP, 1 % Triton-X-100, 10 % Glycerin) dazugegeben, welcher 100× Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) enthielt. Direkt im Anschluss wurde die Zellkulturschale im Kühlschrank auf den Wipptisch gestellt und geschüttelt bis sich die Zellen von alleine lösten (ca. 10 min). Das Lysat wurde in einem 50 ml Falcongefäß vereinigt, im Vortex-Schüttler gemischt, nach einer Zwischenkühlung mit einer Kanüle homogenisiert und anschließend auf 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile für 30 Minuten bei 4 °C und mindestens 13 000 rpm abzentrifugiert und die geklärten Lysate im Falcongefäß wiedervereinigt. Dies ergab das Rohlysate.

#### 3.4.2 Immunopräzipitation

Das Rohlysate wurde für 2 Stunden auf dem Rotationsschüttler bei 4 °C mit 125 µl Protein G Plus-Agarose-Beads (Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. Anschließend wurde für 2 Minuten bei 4 °C und 400 rpm zentrifugiert, der Überstand mit einer Kapillarspritze vollständig abgenommen und in ein neues Falcongefäß überführt. Der Überstand wurde mit 5 µl Mouse Anti-V5-Antikörper (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bei 4 °C für 1–4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 125 µl Protein-G-Beads hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert.

Die Beads wurden vom Lysat durch Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm für 1–2 Minuten getrennt, der Überstand mit einer Kapillarspritze abgenommen und verworfen. Die Beads wurden anschließend mit 500 µl CO-IP Waschpuffer versetzt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde dann für 2 Minuten bei 4 °C und 2800 rpm zentrifugiert und mit dem Überstand nochmals das Falcongefäß ausgespült, um die restlichen Beads aus diesem aufzunehmen.

Im Anschluss wurden die Beads zweimal mit jeweils 500 µl CO-IP Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5 % IGEPAL CA-630) gewaschen und anschließend für 2 Minuten bei 4 °C und 2800 rpm abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Beads bei 4 °C und 6000 rpm für eine Minute vollständig abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und das Bead-Pellet je nach Gelsystem mit 50 µl Laemmli-Puffer bzw. NuPAGE®-LDS-Sample-Puffer versetzt. Der Inhalt des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde dann für 10 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Danach wurde für

2 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das fertige IP-Lysat wurde gefroren und auf Trockeneis nach Freiburg geschickt.

## 3.5 Gelelektrophorese und Probenvorbereitung

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* SDS-PAGE) wurde sowohl das Fertig-Gelsystem der Firma Bio-Rad (Hercules, CA, USA), als auch das Fertig-Gelsystem der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) verwendet. Die für die Probenvorbereitung verwendeten Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 2 ml stammten von Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), die Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 0,2 ml wurden bei der Firma Carl Roth (Carl Roth GmbH + Co. KG, Kalsruhe, Deutschland) erworben.

### 3.5.1 Bio-Rad Gelsystem

Von Bio-Rad wurden Fertig-Polyacrylamid-Gele vom Typ Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> 4–15 %, 10–well comb, 30 µl verwendet. Die Probenvorbereitung wurde dabei nach dem von Bio-Rad vorgeschlagenen Arbeitsablauf durchgeführt. Die Proteinprobe wurde dabei in 20 µl Laemmli-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 25 % Glycerol, 2 % SDS, 0,01 % Bromphenol-Blau) gelöst. Anschließend wurde 1 µl 1 M DTT hinzugegeben und das Protein bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde zur Probe 2,5 µl 1 M IAA hinzugegeben und bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 20 Minuten inkubiert.

Pro Well wurde ein Volumen von ~23 µl auf das Gel gegeben. Als Marker wurde Novex<sup>®</sup> Sharp Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Anschließend lief das Gel bei 200 V für 40 Minuten. Als Laufpuffer diente dabei ein Bio-Rad Tris/Glycine/SDS Buffer (25 mM Tris 192 mM Glyzin 0,1 % (m/v) SDS pH 8,3).

### 3.5.2 Invitrogen Gelsystem

Von Invitrogen wurden Fertiggele vom Typ NuPAGE<sup>®</sup> 4–12 % Bis-Tris Gel 1,0 mm × 9 Well und NuPAGE<sup>®</sup> 4–12 % Bis-Tris Gel 1,0 mm × 15 Well verwendet. Die Probenvorbereitung wurde ebenfalls nach dem von Invitrogen vorgeschlagenen Arbeitsablauf durchgeführt. Die Proteinprobe wurde in 10 µl LDS Sample Puffer (10 % Glycerol, 141 mM Tris Base, 106 mM Tris HCl, 2 % LDS, 0,51 mM EDTA, 0,22 mM SERVA<sup>®</sup> Blue G250, 0,175 mM Phenolrot, pH 8,5) gelöst. Anschließend wurde 1 µl 1 M Invitrogen Reducing Agent 10× (500 mM DTT) hinzugegeben und das Protein bei 70 °C für 10 Minuten denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde zur Probe 1,2 µl 1 M IAA hinzugegeben und bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 20 Minuten inkubiert.

Als Laufpuffer diente NuPAGE<sup>®</sup> MOPS SDS Running Buffer (50 mM MOPS, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS, pH 7,7). Pro Well wurde ein Probenvolumen von ~12 µl bei den 15-Well-Gelen und ein Probenvolumen von ~23 µl bei den 9-Well-Gelen aufgetragen.

### 3 Material und Methoden

Als Marker wurde Novex<sup>®</sup> Sharp Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Anschließend lief das Gel bei 200 V für 40 Minuten.

#### 3.5.3 Färben der Gele

Das Gel wurde aus der Gelelektrophoreseapparatur in eine Gelfärbeschale überführt und dreimal für 5 Minuten mit sauberem Wasser gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Gel mit SimplyBlue<sup>™</sup> Safe Stain von Invitrogen für eine Stunde gefärbt. Anschließend wurde das Gel mit Wasser für 1½ Stunden gewaschen.

#### 3.5.4 Vorbereitung der Gelbanden für den Proteaseverdau

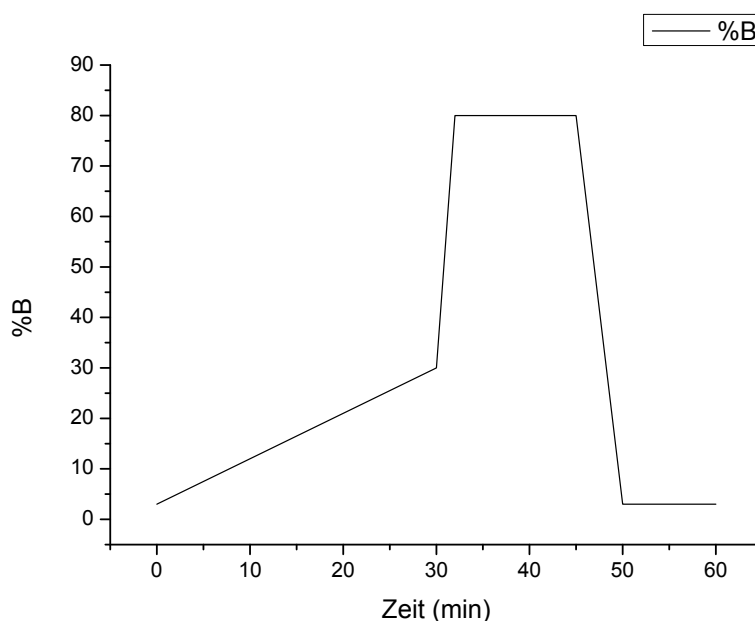
Die zu untersuchenden Gelbanden wurden ausgeschnitten, in kleine Stücke gehäckselt und mit 100 µl 70 % 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> und 30 % ACN bei 1200 rpm für 30 Minuten auf einem Eppendorf-Thermomixer bei Raumtemperatur entfärbt. Falls die Gelbanden nach dem ersten Entfärbeschritt noch eine starke Färbung aufwiesen, wurde der Entfärbeschritt wiederholt. Die Entfärbeflüssigkeit wurde von den Gelstücken entfernt und diese mit 100 µl 100 % ACN geschrumpft. Anschließend wurden die Gelbanden für 30 Minuten im Eppendorf Concentrator im Vakuum getrocknet. Die getrockneten Gelbanden wurden bis zum Proteinverdau im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.6 Proteolytischer Verdau

Für den Verdau wurde von allen Proteasen eine Stammlösung von 0,1 µg/µl angesetzt und diese direkt von dem Verdau im Verhältnis 1:10 mit 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH ~7,8 verdünnt. Bei Trypsin und Elastase wurde der Verdau bei 37 °C über Nacht durchgeführt, bei Chymotrypsin bei 25 °C über Nacht und bei Thermolysin bei 60 °C über 3 Stunden.

### 3.7 Online-Flüssigkeitschromatographie

Die Online-Flüssigkeitschromatographie wurde mit einem Agilent 1200 Nano-Fluss-System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Die Peptide wurden dabei zuerst auf eine 40 nl Vorsäule geladen und anschließend über eine analytische Säule von 150 mm Länge und 75 µm Innendurchmesser aufgetrennt. Beide Säulen waren dabei mit Umkehrphasen-Säulenmaterial vom Typ Zorbax 300SB C-18 (5 µm Partikelgröße) gepackt und befanden sich auf einem Agilent HPLC Chip (siehe Abbildung 3.2 auf Seite 36). Beide Pumpen des Systems waren an Lösungsmittel A: Wasser mit 0,1 % Ameisensäure (*Formic acid*, FA) und Lösungsmittel B: Wasser mit 90 % Acetonitril (ACN) und 0,1 % FA angeschlossen. Die Probe wurde nach der Injektion mittels Autosampler mit einem Fluss von 3 µl/min und einer Lösungsmittelmischung von 97 % A und 3 % B auf die Vorsäule geladen. Nach Umschalten des Ventils im Chip-Cube wurde die Messung gestartet und der Flusspfad auf die Nanopumpe mit einer Flussrate von 300 nl/min und



**Abbildung 3.1** – Elutionsprofil der Nanopumpe bei 50 minütiger Standardmessung, Eluent A: 0,1 % FA; Eluent B: 0,1 % FA, 90 % ACN

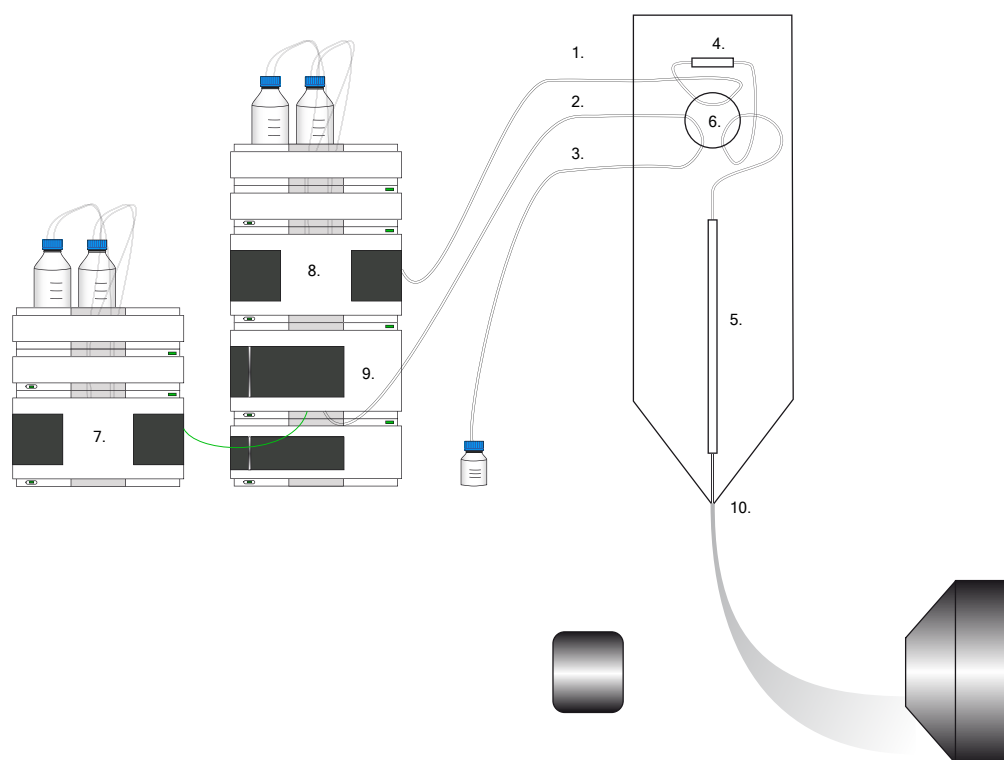
einer initialen Lösungsmittelzusammensetzung von 97 % A und 3 % B umgeschaltet. Die Elution von der Vorsäule über die analytische Säule fand anschließend mit einem Lösungsmittelgradienten von  $+1\% \text{ B } 1/\text{min}$  statt. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 3.1 auf Seite 35 aufgeführt. Nach Ablauf der 50-minütigen Messung wurden beide Säulen 10 Minuten lang mit den Startbedingungen equilibriert.

### 3.8 Massenspektrometer

Die Nano-LC-MS/MS-Messungen wurden auf einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (Agilent 6460), einem Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer (Agilent 6520) und einer ETD-Ionenfalle (Agilent 6340) von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) mit HPLC-Chip-Cube-Interface durchgeführt. Alle Geräte wurden mit vom Hersteller dafür vorgesehenen Tuning-Lösungen kalibriert. Als Kollisionsgas wurden sowohl beim Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, als auch beim Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer Stickstoff in einer Reinheit von 99,9999 % (3Q:  $\sim 2,86 \text{ mPa}$ , Q-TOF  $\sim 2,99 \text{ mPa}$ ) verwendet. Für die ETD-Ionenfalle kam als Kollisionsgas Helium in einer Reinheit von 99,999 % ( $\sim 1,27 \text{ mPa}$ ) zur Anwendung, Ionisationsgas für die chemische Ionisation des ETD-Reaktanden war Methan mit einer Reinheit von 99,9995 %. Als Trockengas diente bei allen Geräten Druckluft.

Für die Messungen wurde das Q-TOF-Massenspektrometer im 2 GHz-Modus mit erweitertem dynamischen Bereich betrieben. Der aufgenommene Massenbereich im MS-

### 3 Material und Methoden



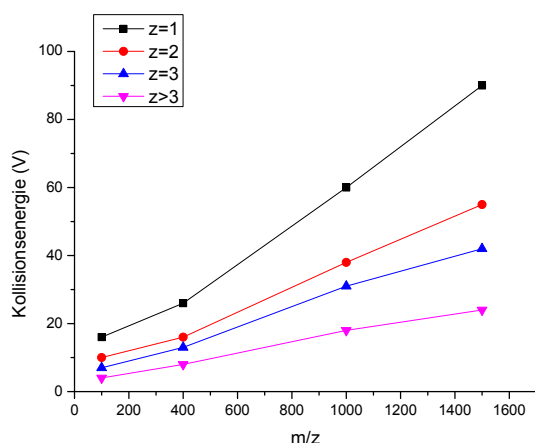
1	Kapillare von Analytischer Pumpe	6	Ventil
2	Kapillare vom Autosampler	7	Ladepumpe
3	Kapillare zum Abfall	8	Nanopumpe
4	Ladesäule	9	Autosampler
5	Analytische Säule	10	metallbedampfte Elektrospray-Nadel

**Abbildung 3.2** – Aufbau des Agilent HPLC-Chip-Systems: Die Probe wird nach Injektion im Autosampler isokratisch mit 3 % Eluent B mit  $3 \mu\text{l}/\text{min}$  auf die Vorsäule geladen. Anschließend wird das Ventil des LC-Chips umgeschaltet und die Probe mit der Nanopumpe bei einer Flussrate von  $0,3 \mu\text{l}/\text{min}$  und einen Eluentengradienten über die Vorsäule und die analytische Säule eluiert. Der Transfer ins Massenspektrometer erfolgt direkt über das integrierte Nano-ESI-Interface des HPLC-Chips.

Spektrum umfasste dabei einen Bereich von  $50\text{--}2400 \text{ m/z}$  bei einer Aquisitionsrate von  $4 \text{ Spektren/s}$  ( $250,2 \text{ ms/Spektrum}$ ). Im  $\text{MS}^2$ -Spektrum umfasste der aufgenommene Massenbereich  $50\text{--}3000 \text{ m/z}$  bei einer Aquisitionsrate von  $2 \text{ Spektren/s}$  ( $500,5 \text{ ms/Spektrum}$ ). Die Kollisionsenergien für die Kollisionzelle waren beim Q-TOF-Massenspektrometer auf die in Abbildung 3.3 (Seite 37) aufgelisteten Werte eingestellt. Der Isolationsbereich für den Quadrupol bei der Aufnahme der  $\text{MS}^2$ -Spektren war auf „Medium“ ( $\sim 4 \text{ Da}$ ) eingestellt.

Die ETD-Ionenfalle wurde im Scanmodus „Standard enhanced“ betrieben. Dabei wur-

### 3.9 Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$



Kollisionsenergie				
m/z	z=1	z=2	z=3	z>3
100	16	10	7	4
400	26	16	13	8
1000	60	38	31	18
1500	90	55	42	24

**Abbildung 3.3** – Einstellung der Kollisionsenergie am Q-TOF abhängig von Ladung und Masse

den für die Ionenfalle ein *Ion charge control*-Wert (ICC) von 350 000–500 000 und eine maximale Akkumulationszeit von 500–700 ms verwendet. Für die CID-Fragmentierung war eine MS/MS Fragmentierungsamplitude von 1,5 V und der „*Smart Frag*“-Parameter auf eine Amplitude von 30–200 % eingestellt. Die Isolationsbandbreite wurde auf  $>20 \text{ m/z}$  gesetzt. Für ETD wurden folgende Parameter verwendet: Reaktantentemperatur  $58^\circ\text{C}$ , Ionisationsenergie 65 eV und Emissionsstrom  $3,0 \mu\text{A}$ . Als ICC für den Reaktanden war ein Zielwert von 400 000 bei einer maximalen Akkumulationszeit von 200 ms eingestellt. Die ETD-Reaktionszeit war auf 100 ms gesetzt, für den Parameter „*Smart Decom*“ war entweder  $z=2$  oder auto ausgewählt.

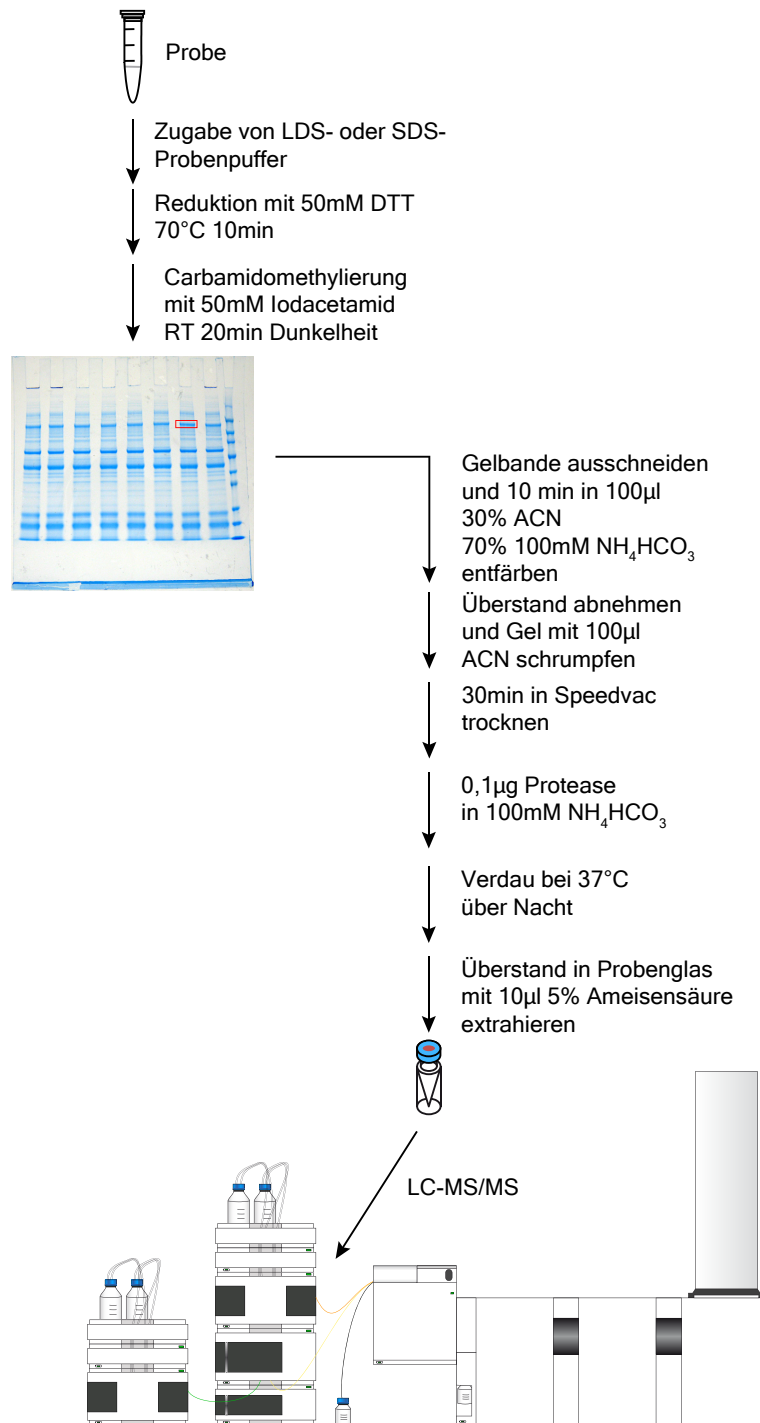
Als Software kam beim Triple-Quadrupol-Massenspektrometer die Software Agilent Masshunter Acquisition (Version B.03.01) zum Einsatz, beim Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer Agilent Masshunter Acquisition (Version B.02.01) und bei der ETD-Ionenfalle Agilent Chemstation (Version B.01.03-SR) und Trap Control 6.2.

### 3.9 Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$

Die Anreicherung der Phosphopeptide mittels Titandioxid wurde auf einem Dionex Ultimate 3000 HPLC-System (mittlerweile Thermo Fisher Scientific, Walton, MA, USA) durchgeführt. Das HPLC-System war dabei eine biokompatible Ausführung, welche Komponenten aus Titan und Polyetheretherketon (PEEK) in den Leitungen und Ventilen verwendet. Die Methode wurde wie in Kapitel 4 (ab Seite 45) beschrieben optimiert. Der Aufbau des Systems ist in Abbildung 3.5 (Seite 40) dargestellt.

Die Laufmittel hatten folgende Zusammensetzung: A: Wasser, 0,1 % FA B: Wasser, 80 % ACN 0,1 % FA. Als Säule wurde eine PEEK-Kapillare von  $100 \mu\text{m}$  Innendurchmesser, welche mit 1 cm Titansphere<sup>TM</sup>-Material mit  $5 \mu\text{m}$  Partikelgröße (GL Sciences, Tokio, Japan) gefüllt war, verwendet. Dieses wurde aus einer in einer Druckbombe von Proxeon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gepackten Fused-Silica-Kapillare in

### 3 Material und Methoden



**Abbildung 3.4** – Arbeitsablauf für die „Bottom-Up“-Proteinanalyse mittels In-Gel-Verdau und LC-MS/MS-Analyse



### 3.9 Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$

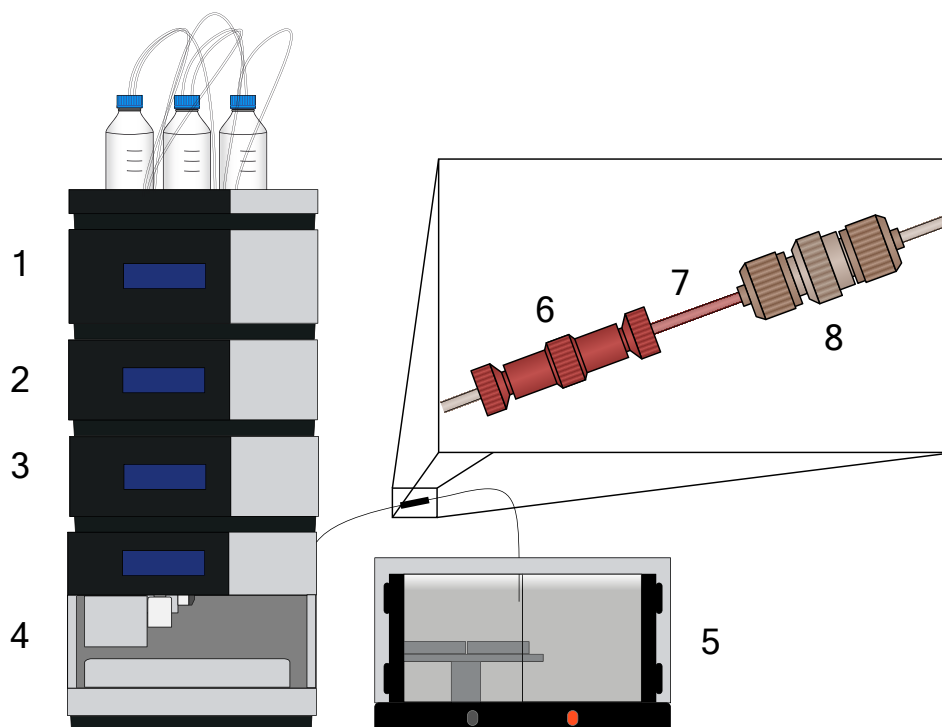
die PEEK-Kapillare überführt, welche an ihrem Ende mit einer Titan-Fritte verschlossen war. Die Probenadel des Autosamplers, bestehend aus einer Fused-Silica-Kapillare, wurde ebenfalls durch eine PEEK-Kapillare gleichen Innendurchmessers ersetzt um eine bessere Resistenz gegenüber den basischen Bedingungen bei der Elution zu erreichen.

In Abbildung 3.6 (Seite 41) ist der Arbeitsablauf für die Anreicherung nach dem Enzymverdau gezeigt. Nach dem Verdau wurde der Lösungsmittelüberstand über der Gelbande abgenommen und 30 Minuten mit 10  $\mu\text{l}$  50 % ACN 0,1 % FA extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die getrockneten Peptide in 5  $\mu\text{l}$  50 % ACN 0,1 % FA aufgenommen. Als Transportflüssigkeit für das Mikroliter-Pickup des Autosamplers beim Laden der Probe wurde ebenfalls 50 % ACN 0,1 % FA verwendet.

Nach der Optimierung der Methode zur Phosphopeptidanreicherung wurde der Ablauf der Phosphopeptidanreicherung mit  $\text{TiO}_2$ , wie in Tabelle 3.1 (Seite 39) dargestellt durchgeführt. Die mobile Phase des Lade- und Waschschrtes wurde in Probenfläschchen 1 gesammelt, die Elution in Probenfläschchen 2. Der Inhalt von Probenfläschchen 1 wurde im Vakuum auf ein Volumen von  $\sim 20 \mu\text{l}$  eingengt und anschließend auf den LC-MS/MS-Systemen (Injektionsvolumen 5  $\mu\text{l}$ ) gemessen, der Inhalt von Probenfläschchen 2 wurde mit 1  $\mu\text{l}$  Ameisensäure angesäuert und danach ebenfalls gemessen (Injektionsvolumen 5  $\mu\text{l}$ ).

Schritt	Dauer min	Flussrate $\mu\text{l}/\text{min}$	Injektion mit	Injektionsvolumen $\mu\text{l}$	Fraktion	Laufmittel %B
1 Injektion	8	5,00	Probe in 50 % ACN 0,1 % FA	4,5	L+W (8 min)	62,5
2 Waschen	15	5,00	30 % ACN 2 % FA	20	L+W (15 min)	0
3 Elution	20	2,00	100 mM CA pH 9,5	20	Eluat (10 min)	0
4 Equilibrierung	15	5,00	100 mM CA pH 9,5	20	-	62,5

**Tabelle 3.1** – Parameter der HPLC-Methoden für die einzelnen Schritte der Phosphopeptidanreicherung mit  $\text{TiO}_2$ ; in Klammern ist die Zeit der Sammlung der Fraktion angegeben; CA: Zitronensäure, L: Ladeschritt, W: Waschschrift



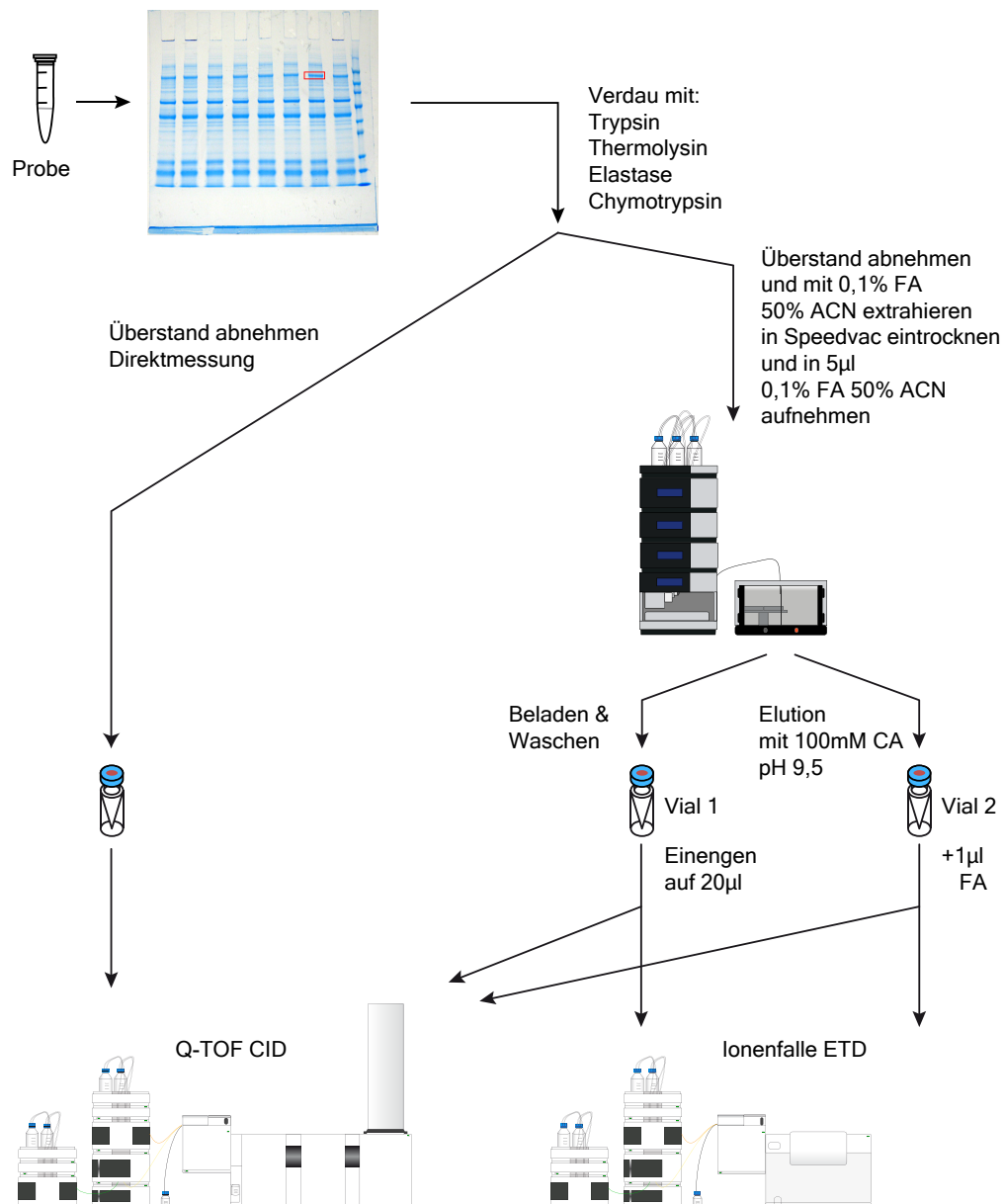
1	Analytische Pumpe	5	Fraktionssammler
2	UV-Detektor (nicht verwendet)	6	Verbindungsstück „Union“
3	Flow-Splitter	7	TiO <sub>2</sub> -Säule
4	Autosampler	8	Titan-Fritte

**Abbildung 3.5** – Aufbau des Dionex Ultimate 3000 Systems zur Phosphopeptid-Anreicherung mit TiO<sub>2</sub>. Die Analytische Pumpe ist über den Flow-Splitter mit dem Autosampler verbunden. Am Autosampler erfolgt die Injektion der Probe als auch der Wasch- und Elutionsflüssigkeit. Die TiO<sub>2</sub>-Säule (7) befindet sich zwischen Union (6) und Titan-Fritte (8) und wird nach dem Packen in einer *Fused silica*-Kapillare in diesen Bereich transferiert. Das Sammeln der Fraktionen erfolgt mit einem Probot Fraktionssammler.

## 3.10 Datenanalyse

### 3.10.1 Analyse der Rohdaten

Für die manuelle Analyse von Precursor-Massenspektren und Fragment-Massenspektren des Q-TOF-Massenspektrometers wurde die Software *Masshunter Qualitative Analysis* von Agilent in der Version B.04.00 verwendet. Für die manuelle Analyse der Ionenfallen-Rohdaten wurde die Software *DataAnalysis for 6300 Series Ion Trap LC/MS 4.0* (Build 234) (Bruker Daltonic, Billerica, MA , USA) verwendet.



**Abbildung 3.6** – Arbeitsablauf für die Phosphoproteinanalyse mittels In-Gel-Verdau, Phosphopeptid-Anreicherung mit  $\text{TiO}_2$  und LC-MS/MS-Analyse

### 3.10.2 Vorprozessierung der Daten für die Datenbanksuche

Für das Prozessieren der Rohdaten für die Datenbanksuche wurde die Software Mascot Distiller der Firma Matrixscience (Matrix Science Ltd., London, UK) in Version 2.3.2.0 verwendet. Die Peaklisten wurden im Mascot Generic Format (.mgf) und auf einfach geladene Peptide umgerechnet ( $\text{MH}^+$ ) erstellt.

#### 3.10.3 Datenbanksuche mit Mascot Server

Für die erstellten .mgf-Dateien wurden Protein-Datenbanksuchen mit der Software Mascot Server der Firma Matrixscience (Version 2.3) (Perkins et al., 1999) durchgeführt. Bei den Einstellungen bei der Mascot Server-Datenbanksuche wurden standardmäßig die variablen Modifikationen Carbamidomethyl (C), Gln->pyro-Glu (N-Term Q), Oxidation (M) und Phospho (ST) gewählt. Bei Messungen mit dem Q-TOF wurde bei den Suchparametern für die Peptid-Massentoleranz im MS-Spektrum ein Wert von  $\pm 50$  ppm und eine Massentoleranz im MS/MS-Spektrum von  $\pm 0,05$  Da eingestellt. Bei Messungen mit der Ionenfalle wurde für die Peptid Massentoleranz im MS-Spektrum ein Wert von  $\pm 1,1$  Da und eine Massentoleranz im MS/MS-Spektrum von  $\pm 0,3$  Da gewählt. Des Weiteren war die Option  $^{13}\text{C}$  auf den Wert 1 gesetzt. Bei Proben mit tryptischem Verdau war bei der Enzymspezifität Trypsin selektiert und bis zu zwei Fehlsplaltungen „*Misscleavages*“ zugelassen. Bei Proben, welche mit Elastase und Thermolysin verdaut wurden, wurde die Datenbanksuche ohne Enzymspezifität durchgeführt. Als Datenbanken kamen eine selbst erstellte Datenbank und Swissprot in der aktuellen Version zum Einsatz.

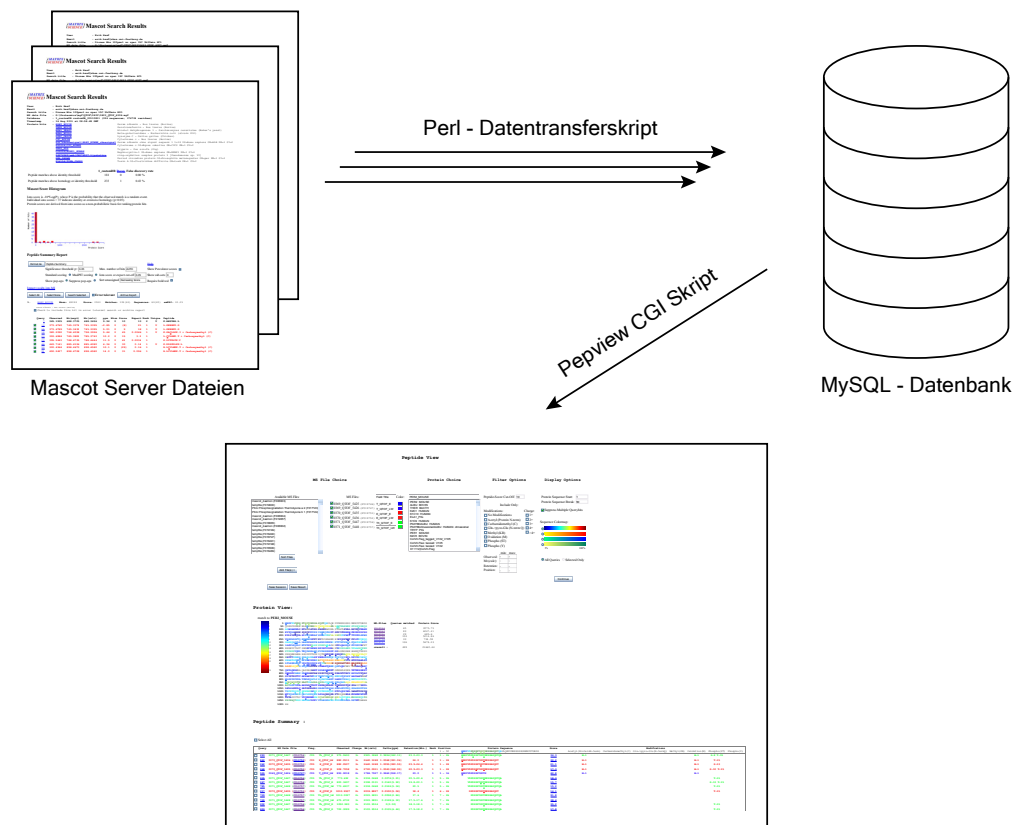
#### 3.10.4 Datenanalyse bei der Bestimmung von Phosphosites

##### Analyse mit Mascot Server und Pepview

Die Ergebnisse der verschiedenen Messungen der Phosphoproteinanalyse nach Multiproteaseverdau und Phosphopeptidanreicherung mit  $\text{TiO}_2$  wurden nach der Datenbanksuche zur besseren Analyse und Visualisierung weiter aufbereitet. Dazu wurde zusammen mit Robert Gawlik und Andreas Schlosser ein HTML-basiertes Datenanalysewerkzeug namens Pepview erstellt. Diese Web-basierte Software besteht aus mehreren Perl-Skripten, die die von der Mascot Server Software abgespeicherten Daten-Dateien (\*.dat) in eine MySQL-Datenbank einlesen. Über eine CGI-Schnittstelle können dann verschiedene Suchen der Mascot Server-Software für ein Protein nebeneinander visualisiert werden, wobei die gefundenen Peptide und posttranslationalen Modifikationen an der Proteinsequenz ausgerichtet werden. Der schematische Aufbau der Software ist in Abbildung 3.7 (Seite 43) dargestellt, die detaillierte CGI-Ausgabe in Abbildungen 19 und 20 (Seiten 248 und 249) im Anhang.

##### Analyse mit Phosm

Zur Validierung der bei Mascot gefundenen Phosphorylierungsstellen wurde die Software Phosm von Schlosser et al. (2007) verwendet. Sie wurde ebenfalls bei der Analyse der Phosphoisomere von mPER1 und mPER2 eingesetzt. Die Parameter „*MS Error Range*“ war dabei auf „Von  $-0,05$  Da bis  $0,05$  Da“ eingestellt, der Parameter „*MS/MS Error*“ auf  $\pm 0,05$  Da. Die Ergebnisse wurde anschließend in den Rohdatenspektren validiert.



**Abbildung 3.7** – Aufbau des Programms Pepview: Verschiedene LC-MS-Läufe für ein Protein, z.B. mit verschiedenen Proteasen, werden in einer Datenbank mit Mascot Server gesucht. Die dabei entstandenen .dat-Dateien werden mit Hilfe eines Perl-Skriptes in einer MySQL-Datenbank in eine relationale Datenbank geschrieben. Mittels eines Perl-CGI-Skriptes kann man sich die gefundenen Peptide für das Protein aus den verschiedenen Suchen kombiniert anzeigen lassen. Die Peptide werden dabei entsprechend ihrer Position in der Proteinsequenz angezeigt. Detailliertere Ansichten der Pepview-Ausgabe finden sich im Anhang in den Abbildungen 19 und 20 (Seite 248 und 249).

### 3.10.5 Sequenz Alignment

Für das Sequenz-Alignment für mPER1 und mPER2 in Abschnitt 6.3.3 (Seiten 204,205) wurde die Software ClustalX (Version 2.0.12) von Higgins et al. (2007); Jeanmougin et al. (1997) verwendet.

### 3.10.6 Berechnung von Isotopenmustern

Für die Berechnung der Isotopenmuster bei den Labelingexperimenten wurde die Software *IDcalc* (Version 0.3) von Michael J. MacCoss (Department of Genome Sciences,

University of Washington, USA) verwendet. Diese Software verwendet einem Algorithmus nach Kubinyi (1991), um die Isotopenmuster von Substanzen zu berechnen, die verschiedene stabile Isotope enthalten. Die so erhaltenen Isotopenverteilungen wurden anschließend mit *Origin Pro* (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA) (Version 8.5.1 SR1) in theoretischen Massenspektren visualisiert.

#### 3.10.7 Quantifizierung

Für die Quantifizierung kamen verschiedene Programme zum Einsatz. Für die manuelle Quantifizierung beim  $^{15}\text{N}$ -Labeling (siehe Kapitel 9 auf Seite 125) wurde die Software *Masshunter Qualitative Analysis* (Version B.04.00) von Agilent, für das labelfreie Quantifizieren bei den Versuchen zum absoluten labelfreien Quantifizieren (siehe Kapitel 7 auf Seite 89) die Software *Masshunter Quantitative Analysis for Q-TOF* (Version B.04.00) von Agilent verwendet. Für die Quantifizierung mittels  $^{18}\text{O}$ -Labeling (siehe Kapitel 10 auf Seite 141) wurde die Software *Mascot Distiller* (Version 2.3.2.0) verwendet.

## 4 Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$

### 4.1 Einleitung

Obwohl Phosphorylierungen an Proteinen in einer Zelle sehr häufig vorkommen, liegt oftmals nur ein geringer Anteil eines Proteins in der phosphorylierten Form vor, und es existiert ein großer Überschuss an unphosphoryliertem Protein. Daher ist es für die Analyse der Phosphorylierung mittels LC-MS oftmals notwendig, diese anzureichern. Dies liegt zum einen an der Unterdrückung des Signales durch hochabundante Peptide, welche vor allem bei der Analyse mittels Ionenfalle eine Rolle spielt, siehe Abschnitt 1.2.1 (Seite 2) im Kapitel Einleitung. Des weiteren werden bei der datenabhängigen Aufnahme der Fragmentspektren in aller Regel Peptide von höherabundanten Proteinen bevorzugt. Außerdem kann die höhere Komplexität einer Probe zu isobaren Überlappungen bei der Aufnahme des Massenspektrums führen und damit die Sequenzanalyse beeinträchtigen. Es ist somit für die qualitative Phosphoproteinanalyse sinnvoll, möglichst nur Peptide zu messen, welche eine Phosphorylierung aufweisen.

Es wurden daher verschiedene Methoden entwickelt, um Phosphoproteine und Phosphopeptide anzureichern. So kann man zum Beispiel eine Phosphoproteinanreicherung durch Anti-Phospho-Antikörper und eine Immunopräzipitation bewerkstelligen. Diese Methode wird vor allem bei phosphoryliertem Thyrosin verwendet (Pandey et al., 2000a,b; Salomon et al., 2003). Dieses besitzt bessere antigene Eigenschaften als Phosphoserin und Phosphothreonin, gegen welche Antikörper nur eine schlechte Spezifität aufweisen (Collins et al., 2007).

Daneben existieren diverse Methoden, um Phosphopeptide aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften anzureichern. Die Phosphatgruppe an Serin, Threonin und Tyrosin besitzt im Vergleich zu unmodifizierten und andersartig modifizierten Peptiden besondere chemische Eigenschaften, welche die Anreicherung der Phosphatgruppe ermöglichen. So bewirkt die niedrige Säurekonstante ( $\text{pK}_\text{S}$ -Wert,  $\text{pK}_\text{S} \approx 2$ ) der Phosphatgruppe zum Beispiel eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes ( $\text{pI}$ -Wert) des Phosphopeptides. Dies kann für eine Fällung der Phosphopeptide (Reynolds et al., 1994), für eine teilweise Anreicherung der Phosphopeptide bei der isoelektrischen Fokussierung (Maccarrone et al., 2006) oder bei der Ionenaustauschchromatographie genutzt werden. Außerdem können sowohl Kationenaustauschchromatographie (Ballif et al., 2004; Beausoleil et al., 2004) als auch Anionenaustauschchromatographie (Han et al., 2008) bei der Phosphopeptidanreicherung Anwendung finden. Ebenso kann *Hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) für die Vorfraktionierung und Anreicherung von Phosphopeptiden verwendet werden (Alpert, 1990; McNulty und Annan, 2008). Daneben existieren außerdem Methoden, welche direkt chemische Reaktionen an der Phosphat-

#### 4 Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$

gruppe zur Anreicherung nutzen. Als Beispiel sind *Phosphoramidate chemistry* (PAC) (Zhou et al., 2001) und die  $\beta$ -Elinierung von Phosphat an Serin und Threonin (Meyer et al., 1986), siehe auch Abschnitt 8.3.11 Seite 119, zu nennen. Als eine weitere Eigenschaft besitzt die Phosphatgruppe ähnlich wie die Carboxygruppe zwei nahe beieinander liegende Sauerstoffatome. Diese können mit Metallionen starke zweizählige Interaktionen ausbilden. Durch die mögliche Stabilisierung von zwei negativen Ladungen in der Phosphatgruppe von Phosphomonoestern ist diese Interaktion im Vergleich zur Carboxygruppe sogar noch erhöht. Diesen Umstand machen sich die Anreicherung von Phosphopeptiden mittels *Immobilized metal ion affinity chromatography* (IMAC) zunutze ebenso wie die Anreicherung mit Hilfe von Metalloxiden *Metal oxide affinity chromatography* (MOAC) wie zum Beispiel  $\text{TiO}_2$  (Larsen et al., 2005),  $\text{ZrO}_2$  (Kweon und Hakansson, 2006),  $\text{HfO}_2$  (Rivera et al., 2009),  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  (Ficarro et al., 2008),  $\text{SnO}_2$  (Sturm et al., 2008) oder  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Wolschin et al., 2005). Bei IMAC liegen die Metallionen von  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zr}^{3+}$  oder  $\text{Ni}^{2+}$  gebunden als Chelatkomplexe auf einem organischen Trägermaterial wie Iminodiessigsäure oder Nitriloessigsäure vor (Andersson und Porath, 1986; Andersson, 1991; Posewitz und Tempst, 1999) und besitzen dabei mindestens zwei freie Koordinationsstellen. Die Elution der Phosphopeptide von der Säule kann bei IMAC sowohl mit alkalischem Puffer, als auch unter sauren Bedingungen geschehen. Bei Verwendung von MOAC findet die Interaktion der Phosphatgruppe mit der Oberfläche der Metalloxidpartikel statt. Um die Selektivität der Bindung von Phosphopeptiden an das  $\text{TiO}_2$ -Material zu erhöhen, werden verschiedene Additive wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (Larsen et al., 2005), das Natriumsalz der 1-Octansulfonsäure (Mazanek et al., 2007), Glutaminsäure (Wu et al., 2007), Pthalsäure (Thingholm et al., 2006), Heptafluorobuttersäure (HFBA) (Mazanek et al., 2010) und Milchsäure (Sugiyama et al., 2007) im Ladepuffer verwendet.

Die verschiedenen Methoden der Phosphopeptidanreicherung zeigen hierbei unterschiedliche Spezifitäten. MOAC besitzt dabei im Vergleich zu IMAC eine höhere Säulenkapazität und eine höhere Selektivität für Phosphopeptide (Larsen et al., 2005). Bodenmiller et al. (2007) stellten beim Vergleich von PAC-, IMAC- und  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung nur eine Überlappung von ca. 33-34% an identisch identifizierten Phosphopeptiden bei den verschiedenen Anreicherungsmethoden fest. Außerdem war die Anzahl der gefundenen mehrfach phosphorylierten Peptide bei der Anreicherung mittels IMAC höher als bei der Anreicherung mit  $\text{TiO}_2$ , was auch von Jensen und Larsen (2007) beobachtet wurde. Dieser Umstand wurde von Thingholm et al. (2008) für die Entwicklung von *Sequential elution from IMAC* (SIMAC) genutzt, welches eine Kombination aus IMAC für die Anreicherung multiphosphorylierter Peptide und  $\text{TiO}_2$  für die Anreicherung monophosphorylierter Peptide nutzt. Dabei werden die monophosphorylierten Peptide beim Beladen und einer ersten Elution im sauren Milieu von der IMAC-Säule eluiert und anschließend über  $\text{TiO}_2$  angereichert. Anschließend werden die multiphosphorylierten Peptide im alkalischen Milieu von der IMAC-Säule eluiert. Somit können die mono- und multiphosphorylierten Peptide in verschiedenen LC-MS-Läufen gemessen werden. Die Autoren erklären den beobachteten Bias von  $\text{TiO}_2$  für monophosphorylierte Peptide damit, dass die multiphosphorylierten Peptide sehr stark an das  $\text{TiO}_2$ -Material binden



und daher nur schlecht eluiert werden. Die von uns durchgeführten Experimente zeigen, dass es möglich ist, auch multiphosphorylierte Peptide vollständig von  $\text{TiO}_2$ -Material zu eluieren, siehe Abschnitt 4.3.2 (Seite 52).

Weitere Informationen über das Themengebiet der Phosphopeptidanreicherung sind in den Reviews von Dunn et al. (2010) und Eyrich et al. (2011) sowie im Buch „Protein Phosphorylation Analysis by Electrospray Mass Spectrometry“ von Lehmann (2010) zu finden.

## 4.2 Material und Methoden

Bei der Optimierung der Phosphopeptidanreicherung mittels  $\text{TiO}_2$ -Säule wurden sämtliche Versuche an einer Dionex Ultimate 3000 HPLC (mittlerweile Thermo Fisher Scientific) in der biokompatiblen Version (Materialien aus Titan oder PEEK) durchgeführt. Die Fraktionen der Anreicherung wurden dabei mittels eines zugehörigen Probot-Fraktionskollektors gesammelt.

Am Anfang der Methodenoptimierung bestand der Flusspfad nach dem Injektionsventil als auch die Probennadel des Autosamplers aus Quarz-Kapillaren (*Fused silica*) (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). Die Säule war dabei in einer Quarz-Kapillare mit einem Innendurchmesser von  $50\mu\text{m}$  gepackt, welche mit einer Glasfilterfritte verschlossen war. Diese wurde aus einem Glasfaserplättchen und Natriumsilikat nach Maiolica et al. (2005) hergestellt. Die Kapillare wurde anschließend mit einer Proxeon-Druckbombe (mittlerweile Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit Titansphere<sup>TM</sup>-Material gepackt, bis eine Säulenlänge von ungefähr 1 cm erreicht war. Die PEEK-Kapillaren wurden bei Upchurch Scientific (IDEX Health & Science LLC, Oak Harbor, WA, USA) erworben, die Fittings für die Verschraubung der Säulen und des Filters stammten ebenfalls von Upchurch Scientific. Für die Optimierung der Methode wurden als Testpeptide die Peptidmischungen A und B und isotopenmarkierte Aqua-Peptide von Sigma Aldrich verwendet. Die Sequenzen der Peptide sind in Tabelle 1 (Seite 222) im Anhang zu finden. Außerdem wurde zum Testen der Recovery von mehrfach phosphorylierten Peptiden von der  $\text{TiO}_2$ -Säule ein Phosphopeptid-Mix mit 7 Phosphopeptiden (7P-Mix) verwendet (AG Lehmann, DKFZ, Heidelberg). Die Sequenzen der verwendeten Peptide des 7P-Mixes sind in Tabelle 2 (Seite 223) im Anhang zu finden.

## 4.3 Ergebnisse

Die Period-Proteine weisen nach bisherigen Erkenntnissen viele Phosphorylierungsstellen auf. Insbesondere für der Bereich der FASP-Site wurden Phosphorylierungen identifiziert, welche nahe beieinander liegen. Somit waren entsprechend auch multiphosphorylierte Peptide nach dem Verdau zu erwarten. Der Fokus der Optimierung der Phosphopeptidanreicherung mittels  $\text{TiO}_2$  lag daher darin, neben einer hohen Selektivität für Phosphopeptide auch eine gute Recovery von der Säule insbesondere für mehrfach phosphorylierte Peptide zu erreichen. Daneben war es Ziel der Untersuchungen zu ermitteln, ob in Analogie zu HILIC bei Phosphopeptiden (McNulty und Annan, 2008) und der

dortigen Elution der Phosphopeptide mit polaren Eluenten, auch bei  $\text{TiO}_2$  eine Elution der Phosphopeptide von der stationären Phase durch einen sauren Eluenten möglich ist. Außerdem sollte untersucht werden, ob es möglich ist, einfach und mehrfach phosphorylierte Peptide chromatographisch von der  $\text{TiO}_2$ -Säule zu eluieren.

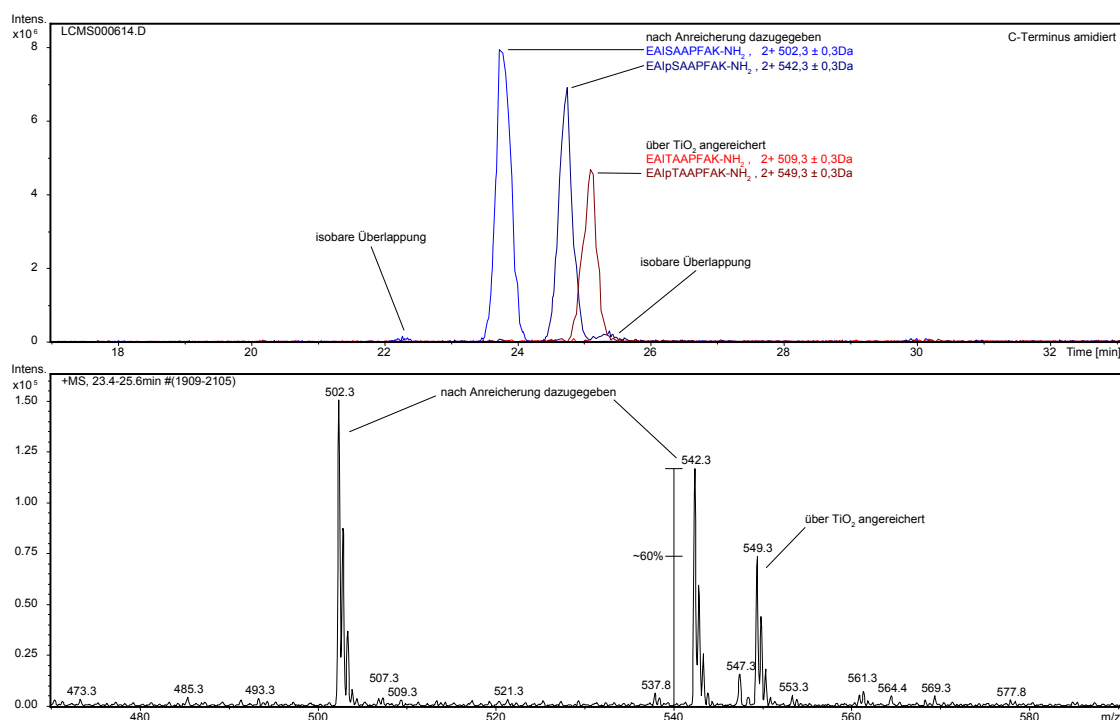
##### 4.3.1 Anreicherung monophosphorylierter Peptide

Für die ersten Versuche zur Optimierung der Phosphopeptidanreicherung stand die Etablierung einer guten Peptidrecovery von der Säule im Vordergrund. Diese Versuche wurden mit dem Phosphopeptidmix A und B durchgeführt. Dabei wurde ein Paar des Peptidmixes mit einem phosphorylierten Peptid und einem unphosphorylierten Peptid der Phosphopeptid-Anreicherung unterzogen und das zweite Paar, welches ebenfalls aus phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptid bestand, anschließend der Probe hinzugegeben. Es wurden jeweils 500 fmol der Peptide verwendet.

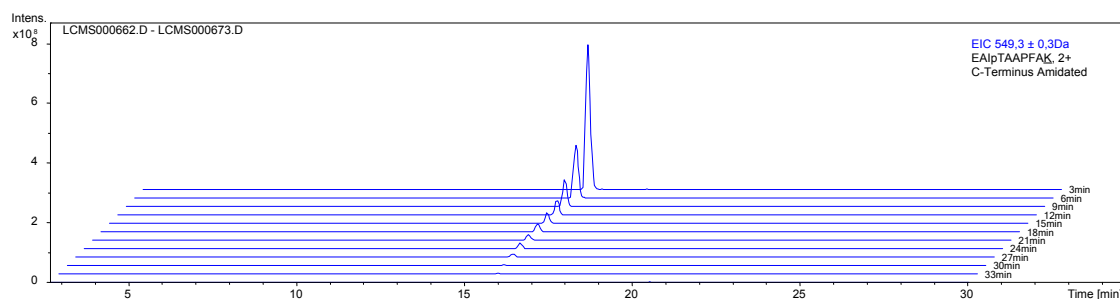
Das Laden der Probe in einem Volumen von 5  $\mu\text{l}$  auf die Säule erfolgte vor der Optimierung mit 30 % ACN und 0,1 % FA bei einer Flussrate von 0,8  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 45 Minuten. Anschließend erfolgte ein Waschschritt mit 20  $\mu\text{l}$  30 % ACN und 0,1 % FA bei einer Flussrate von 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 30 Minuten. Die Elution der Probe erfolgte mit 20  $\mu\text{l}$  0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung, welche mit Ammoniakwasser auf einen pH-Wert von 9 eingestellt war, mit einer Flussrate von 0,8  $\mu\text{l}/\text{min}$  für 35 Minuten. Das Volumen des gesammelten Eluates betrug ungefähr 20  $\mu\text{l}$ . Das Eluat wurde mit 1  $\mu\text{l}$  konzentrierter FA angesäuert und anschließend davon 5  $\mu\text{l}$  auf den LC-MS Systemen analysiert.

In Analogie zu den Versuchen zur Recovery von Phosphopeptiden über  $\text{C}_{18}$ -Material und Zitronensäure von Seidler et al. (2011) wurde anstelle des Ammoniumhydrogencarbonats zur Elution der Phosphopeptide von der  $\text{C}_{18}$ -Säule auch 100 mM Zitronensäure und Citrat bei verschiedenen pH Werten verwendet. Da das  $\text{TiO}_2$ -Säulenmaterial neben Phosphopeptiden auch Peptide mit sauren Aminosäuren bindet, war die Idee dabei, die Phosphopeptide mittels der Säure aus ihrer Bindung zum Metalloxid zu verdrängen, anstatt sie durch den Einsatz einer Base zu protonieren. Bei den Versuchen mit Zitronensäure stellte sich heraus, dass die Verwendung von Zitronensäure/Citrat tatsächlich einen Einfluss auf den für die Elution von  $\text{TiO}_2$ -Material benötigten pH-Wert hat. So war bei der Verwendung von 100 mM Zitronensäure schon bei einem pH-Wert von 4 eine teilweise Elution der Phosphopeptide vom Säulenmaterial zu beobachten. Es gelang aber erst ab einem pH-Wert von 7,5 eine Elution des Phosphopeptides zu erreichen, welche gleichwertig zu einer Elution mit 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  bei pH 9,5 war. Nachdem unter den angegebenen Bedingungen eine Recovery des Phosphopeptides von circa 60 % erreicht wurde (siehe Abbildung 4.1, Seite 49), wurde die Elution mittels des Probensammlers in Fraktionen zu je 3 Minuten aufgeteilt um das Elutionsverhalten des Phosphopeptides zu untersuchen.

Das dabei erhaltene Elutionsprofil ist in Abbildung 4.2 (Seite 49) dargestellt. Die größte Menge an Phosphopeptid eluiert in den ersten 2,4  $\mu\text{l}$  der ersten drei Minuten. Es findet jedoch bei der Elution von der Säule ein ausgeprägtes Tailing statt, so dass in der 30-Minuten-Fraktion und nach 21,6  $\mu\text{l}$  Eluent immer noch Phosphopeptid zu finden ist. In den folgenden Versuchen wurde daher versucht, das Elutionsprofil zu optimieren. Dabei



**Abbildung 4.1** – Recovery des Phosphopeptids EAlpTAAPFAK-NH<sub>2</sub> ( $m/z = 549,3$ ) von der TiO<sub>2</sub>-Säule bei Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 7, 0,8  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Der Peptidmix B, bestehend aus den Peptiden EAlpSAAPFAK-NH<sub>2</sub> ( $m/z = 542,3$ ) und EAISAAPFAK-NH<sub>2</sub> ( $m/z = 502,3$ ), wurde nach der Anreicherung äquimolar zu der Probe hinzugegeben.



**Abbildung 4.2** – Elutionsprofil des Phosphopeptids EAlpTAAPFAK-NH<sub>2</sub> ( $m/z = 549,3$ ) von TiO<sub>2</sub>-Säule bei Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 7, 0,8  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Mit dem Fraktionssammler wurde ab Anfang der Elution für jeweils 3 min ein Volumen von 2,4  $\mu\text{l}$  in ein Probenfläschchen gesammelt. Diese Fraktionen wurden anschließend an der Ionenfalle gemessen und die EICs für das Phosphopeptid gemeinsam dargestellt.

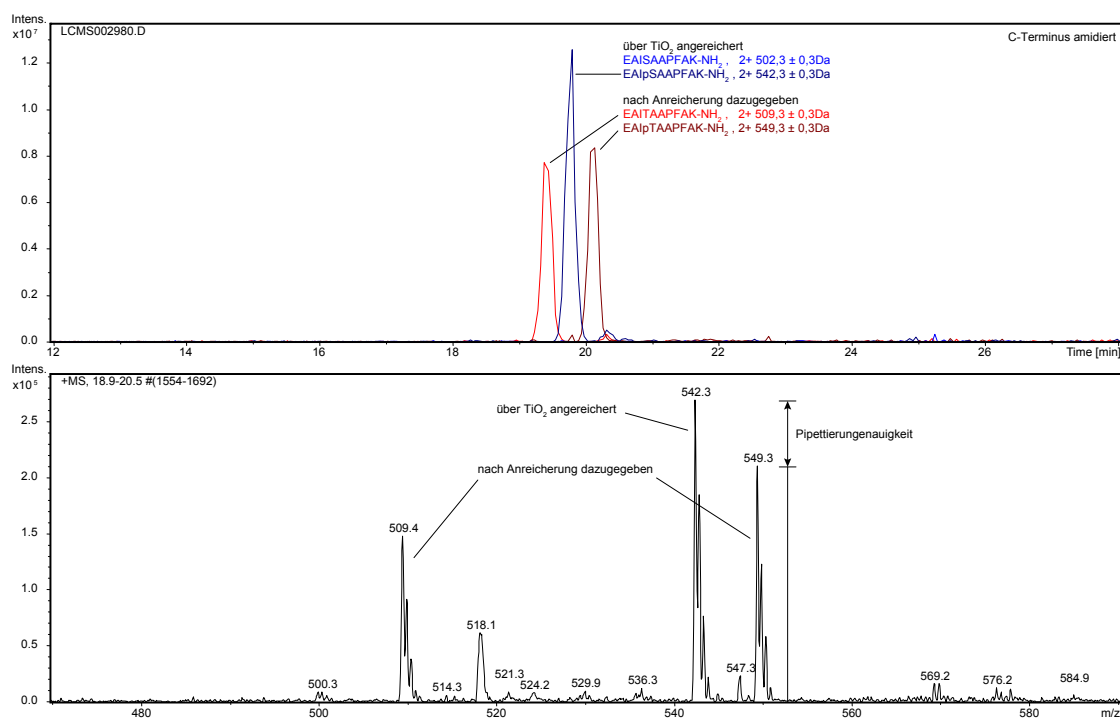
wurden sowohl die Flussrate für die Elution verändert (0,4–2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ), als auch Säulen mit anderem Durchmesser (100–150  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser) verwendet. Diese Änderungen

#### 4 Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$

zeigten jedoch keine wesentlichen Verbesserungen des Elutionsprofils in Bezug auf die Elution an Phosphopeptid pro  $\mu\text{l}$  Durchfluss. Auch die Verwendung eines Säulenofens mit Temperaturen von bis zu  $60^\circ\text{C}$  und die Zugabe von Acetonitril bei der Elution führten nicht zu einer Verbesserung des Elutionsprofils. Es ist daher anzunehmen, dass für das Tailing des Phosphopeptides Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial verantwortlich sind, welche durch die verwendeten Versuchsbedingungen nicht beeinflusst worden sind. Da die Flussrate dem Ergebnis der Versuche zufolge keinen großen Einfluss auf das Elutionsprofil hatte, konnte diese für das Beladen, Waschen und die Elution von der Säule erhöht und somit der Zeitbedarf pro Anreicherung reduziert werden.

Nach den Versuchen zur Elution der Phosphopeptide wurde die Lösungsmittelzusammensetzung für den Wasch- und Beladeschritt der Anreicherung optimiert. Bei der Optimierung des Waschschriffs wurde zuerst untersucht, inwiefern die Zugabe von Acetonitril die unerwünschte Elution von Phosphopeptiden während des Waschschriffs beeinflusst. Dazu wurde ein Waschschrift mit  $20\mu\text{l}$  5 % FA und ein Waschschrift mit  $20\mu\text{l}$  30 % ACN, 5 % FA verglichen. Es war zu beobachten, dass die Zugabe von Acetonitril den Verlust an Phosphopeptid während des Waschschriffs verringert. Es stellte sich im Laufe der Experimente eine Zusammensetzung der Waschflüssigkeit von 30 % ACN 2 % FA, wie auch von Schlosser et al. (2005) und Cantin et al. (2007) beschrieben, als ein guter Kompromiss aus der Spezifität des Waschschriffs für Nichtphosphopeptide und dem Verlust von Phosphopeptiden heraus. Es wurde außerdem die Acetonitrilkonzentration der Transportflüssigkeit und der Lösungsmittelzusammensetzung beim Beladen der Säule variiert, um dort die optimalen Bedingungen zu finden. Dabei stellte sich heraus, dass beim Beladen mit 50 % ACN 0,1 % FA die Phosphopeptide besser an die  $\text{TiO}_2$ -Säule binden als beim Beladen mit 0,1 % FA. Für komplexe Proben kann durch die Zugabe von Milchsäure beim Laden und Waschen der Phosphopeptidprobe die Spezifität der Anreicherung gegenüber sauren Peptiden erhöht werden (Sugiyama et al., 2007). Durch Injektion und Waschen mit  $300\text{ mg/ml}$  Milchsäure in 50 % ACN 0,1 % FA wurde die Spezifität des Lade- und Waschschriffs für Phosphopeptide erhöht. Allerdings war die Recovery der Phosphopeptide schlechter, so dass sich dieses Additiv vorwiegend für sehr komplexe Proben eignet und daher nicht für die immunopräzipitierten mPER-Proteine verwendet wurde.

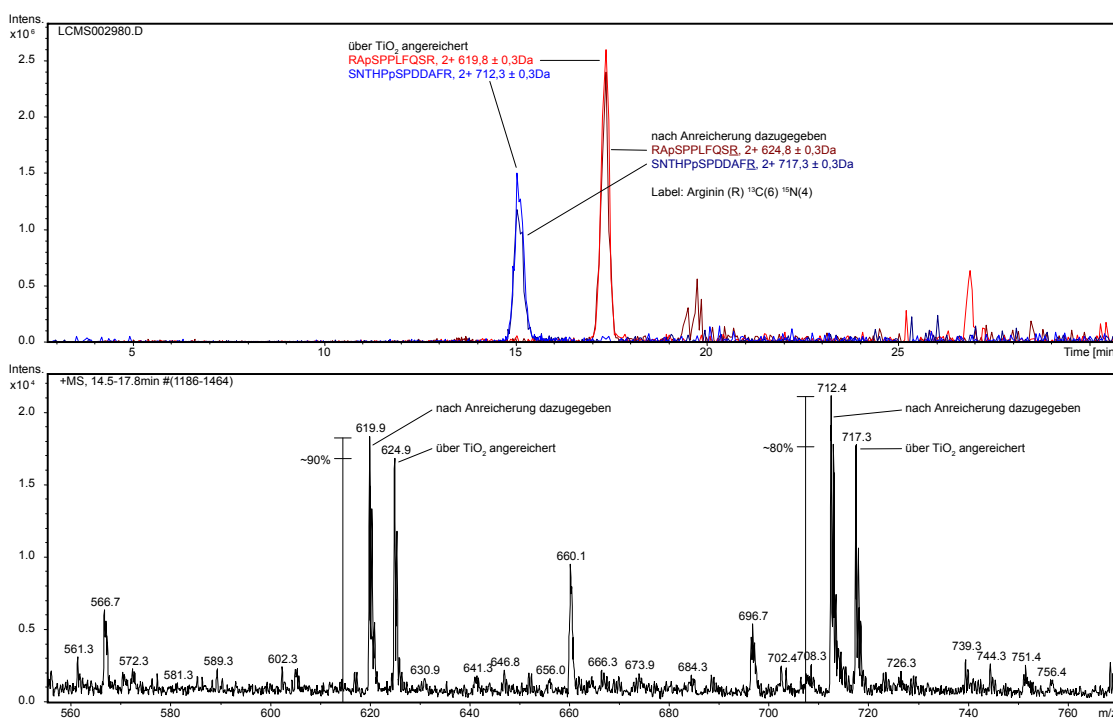
Im Anschluss an die Experimente zum Laden der Probe wurde untersucht, ob die Elution des Phosphopeptids von der  $\text{TiO}_2$ -Säule mit anderen Säuren als Zitronensäure bzw. deren korrespondierenden Salzen gelingt. Für die Versuche wurden Ascorbinsäure, Ascorbinsäure-2-Phosphat-Sesquimagnesium-Salz und Quadratsäure verwendet. Die Elution erfolgte dabei mit jeweils 100 mM-Lösungen. Dabei wurde die Elution sowohl im sauren Bereich mit pH ca. 1,5 als auch im basischen Bereich mit pH ca. 7,5 durchgeführt. Die Elution der Phosphopeptide erwies sich dabei in allen Fällen im sauren pH Bereich wesentlich schlechter als im basischen pH Bereich. Die zusätzlich getesteten Säuren waren aber in allen Fällen der Elution mit 100 mM Zitronensäure bei pH 7,5 unterlegen. Um der stärkeren Bindung mehrfach phosphorylierter Peptide an das  $\text{TiO}_2$ -Material Rechnung zu tragen und eine möglichst vollständige Elution aller Phosphopeptide zu erreichen, wurde der pH-Wert der Citrat-Lösung bei der Elution auf 9,5 erhöht.



**Abbildung 4.3** – Recovery des Phosphopeptids EAIpSAAPFAK-NH<sub>2</sub> ( $m/z = 542,3$ ) von der TiO<sub>2</sub>-Säule bei Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 9,5 2  $\mu$ l/min, Der Peptidmix A, bestehend aus den Peptiden EAIpTAAPFAK-NH<sub>2</sub> ( $m/z = 549,3$ ) und EAITAAPFAK-NH<sub>2</sub> ( $m/z = 509,3$ ), wurde nach der Anreicherung äquimolar zu der Probe hinzugegeben.

Es traten dann jedoch Probleme mit den Quarzglas-Kapillaren und insbesondere mit der Glasfritte am Säulenabschluss auf. Die Glasfritte wurde bei den alkalischen pH-Werten chemisch angegriffen, was nach einigen Elutionsläufen zu deren Versagen und damit zum Verlust der jeweiligen Säule führte. Daher wurde das HPLC-System sukzessive auf PEEK-Kapillaren umgestellt. Auch die Nadel des Autosamplers wurde durch eine PEEK-Kapillare mit gleichem Volumen ersetzt. Der Aufbau des Systems nach der Umstellung ist in Abbildung 3.5 auf Seite 40 zu sehen. Nach dem Umbau wurde die Säule zunächst ein PEEK-Filter abgeschlossen, was jedoch zu Problemen bei der Elution führte. Da die Elution im wässrigen Milieu ohne Acetonitril-Zusatz erfolgte, wurden die Phosphopeptide zwar vom TiO<sub>2</sub>-Material eluiert, adsorbierten aber anschließend am PEEK-Material des Filters und wurden erst bei der Equilibrierung auf die Startbedingungen von diesem eluiert. Daher wurde der PEEK-Filter durch einen Filter aus Titan ersetzt. Für den Test der Recovery wurden je 20 pmol an Peptidmix A und B und AQUA-Peptiden eingesetzt. Die Recovery der FMP-Peptide war unter diesen Bedingungen sehr gut und ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Dabei wurde das Peptidpaar EAISAAPFAK-NH<sub>2</sub>/EAIpSAAPFAK-NH<sub>2</sub> über TiO<sub>2</sub> angereichert und das Peptidpaar EAITAAPFAK-NH<sub>2</sub>/EAIpTAAPFAK-NH<sub>2</sub> nach der Anreicherung zur Probe gegeben.

#### 4 Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$

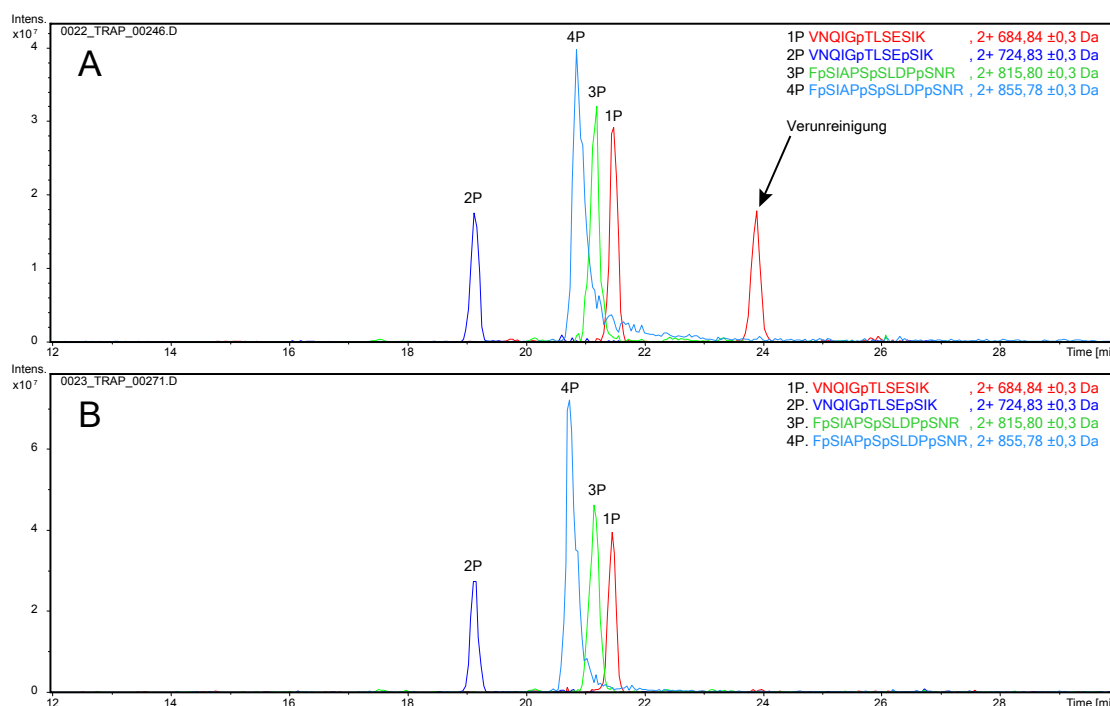


**Abbildung 4.4** – Recovery der AQUA-Phosphopeptide RApSPPLFQSR ( $m/z = 619,8$ ) und SNTHPpSPDDAFR ( $m/z = 712,3$ ) von der  $\text{TiO}_2$ -Säule bei Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 9,5, 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die isotopenmarkierten Peptide RApSPPLFQSR( $6 \times ^{13}\text{C}$   $4 \times ^{15}\text{N}$ ) ( $m/z = 624,8$ ) und SNTHPpSPDDAFR-( $6 \times ^{13}\text{C}$   $4 \times ^{15}\text{N}$ ) ( $m/z = 717,3$ ) wurden nach der Anreicherung äquimolar zu der Probe hinzugegeben.

Die höhere Peakintensität des über  $\text{TiO}_2$ -angereicherten Peptids im Vergleich zur Referenz resultiert vermutlich aus Abweichungen beim Pipettieren sehr kleiner Volumina. Im Fall der phosphorylierten AQUA-Peptide wurden die mit schweren Arginin ( $6 \times ^{13}\text{C}$   $4 \times ^{15}\text{N}$ ) isotopenmarkierten Varianten der Peptide RApSPPLFQSR und SNTHPpSPDDAFR über  $\text{TiO}_2$  angereichert während die nicht markierten Varianten direkt vor der LC-MS-Messung zur Probe hinzugefügt wurden. Hierbei ergab sich ein passendes Verhältnis zwischen angereicherten und nicht angereicherten Peptiden. Die zusammen mit den FMP-Peptiden gemessenen phosphorylierten AQUA-Peptide wiesen eine Recovery im Bereich von ungefähr 80–90 % auf, siehe Abbildung 4.4.

##### 4.3.2 Anreicherung multiphosphorylierter Peptide

Nachdem die Optimierung der Phosphopeptidanreicherung durch  $\text{TiO}_2$  mit einfach phosphorylierten Peptiden und einer guten Recovery erfolgreich war, wurde getestet, ob die Anreicherung auch mit mehrfach phosphorylierten Peptiden funktioniert. Dazu wurde der sog. 7P-Mix verwendet, welcher von der Arbeitsgruppe von Professor Lehmann vom



A | Direktinjektion der Peptide in 100 mM Zitronensäure  
 B | Injektion der Peptide nach  $\text{TiO}_2$ -Anreicherung; Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 9,5

**Abbildung 4.5** – Vergleich der Peptide VNQIGpTLSESIK 1×P ( $m/z = 684,84$ ), VNQIGpTLSEpSIK 2×P ( $m/z = 724,83$ ), FpSIAPSpSLDPpSNR 3×P ( $m/z = 815,80$ ) und FpSIAPpSpSLDPpSNR 4×P ( $m/z = 855,78$ ) bei direkter Messung des 7P-Mixes und nach Anreicherung über  $\text{TiO}_2$  bei Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 9,5. Auch mehrfach phosphorylierte Peptide werden gut von der  $\text{TiO}_2$ -Säule eluiert, die nichtphosphorylierte Verunreinigung hingegen ist durch die Phosphopeptidanreicherung entfernt worden.

Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zur Verfügung gestellt wurde. Die Sequenzen der darin enthaltenen Phosphopeptide sind im Anhang in Tabelle 2 auf Seite 223 dargestellt. Der Phosphopeptid-Mix wurde für den Versuch einmal nach der in Abschnitt 6.2.3 auf Seite 65 beschriebenen Methodik direkt mit 100 mM Zitronensäure auf der Ionenfalle gemessen (Abbildung 4.5, Teil A) und einmal der optimierten Phosphopeptidanreicherung mit  $\text{TiO}_2$  unterzogen und anschließend ebenfalls auf der Ionenfalle gemessen (siehe Abbildung 4.5, Teil B). Wie in der Abbildung zu erkennen ist, eignet sich die optimierte Methode zur Phosphopeptidanreicherung mittels  $\text{TiO}_2$  auch für mehrfachphosphorylierte Peptide. Auch höherphosphorylierte Peptide werden unter den vorhandenen Bedingungen zuverlässig von der Titandioxid-Säule eluiert. Die in Teil A

der Abbildung dargestellte, mit dem Peptid VNQIGpTLSESIK isobare Verunreinigung wurde durch die Phosphopeptid-Anreicherung entfernt.

### 4.4 Diskussion

Nach der Optimierung der Lade-, Wasch- und Elutionsbedingungen können mit der beschriebenen Methode der Phosphopeptidanreicherung mittels  $\text{TiO}_2$  sowohl einfach als auch mehrfach phosphorylierte Peptide zuverlässig angereichert werden. Die Phosphopeptide konnten nur unter alkalischen Bedingungen vollständig von der  $\text{TiO}_2$ -Säule eluiert werden und nicht wie beabsichtigt unter sauren Bedingungen. Die Elution der Phosphopeptide von der  $\text{TiO}_2$ -Säule in einem scharfen Peak konnte auch unter verschiedenen Bedingungen nicht erreicht werden. Vermutlich gibt es neben der Interaktion der Phosphatgruppen mit dem  $\text{TiO}_2$ -Material und hydrophoben Interaktionen der Peptide weitere Interaktionen welche die Elution beeinflussen. Es wären daher noch weitere Untersuchungen vonnöten, um die Ursache für das Tailing der Phosphopeptide bei der Elution von der  $\text{TiO}_2$ -Säule aufzuklären. Bei einigen hydrophoben Phosphopeptiden war zu beobachten, dass diese nach dem Anreicherungsschritt nicht mehr detektiert werden konnten. Ursache dafür könnte eine Adsorption dieser Peptide an das Material der PEEK-Kapillare nach der  $\text{TiO}_2$ -Säule sein ähnlich dem Effekt, der bei Verwendung einer PEEK-Fritte zum Abschluss der  $\text{TiO}_2$ -Säule zu beobachten war. Die Zugabe einer geringen Konzentration von Acetonitril bei der Elution würde diese Adsorption verringern, es wurde jedoch noch nicht untersucht, inwiefern dieser Parameter die Elution der Phosphopeptide beeinflusst.

Die optimierte Methode für die Anreicherung der Phosphopeptide mittels  $\text{TiO}_2$  wurde für die qualitative Analyse der Phosphorylierung von mPER1 als auch mPER2 nach dem Verdau mit verschiedenen Proteasen verwendet, siehe Kapitel 6 ab Seite 63. Ebenso wurde sie bei den Versuchen zur labelfreien Bestimmung des Phosphorylierungsgrades in Kapitel 7 ab Seite 89 und bei den Experimenten zum  $^{15}\text{N}$ -Labeling in Kapitel 9 ab Seite 125 und zum  $^{18}\text{O}$ -Labeling in Kapitel 10 ab Seite 141 verwendet. Die verwendeten Parameter der einzelnen Schritte der Phosphopeptidanreicherung sind in Tabelle 3.1 auf Seite 39 im Kapitel 3 ab Seite 31 zusammengefasst.



## 5 Identifizierung von Interaktionspartnern des Proteins mPER2

### 5.1 Material und Methoden

Für die Identifikation der Interaktionspartner von mPER2 wurde das Protein nach der Immunopräzipitation wie in Abschnitt 3.5 beschrieben reduziert und alkyliert und anschließend eine Gelelektrophorese mit dem Invitrogen-Gelsystem für 45 Minuten durchgeführt. Die Gelspur wurde anschließend in 25 Teile unterteilt. Diese wurden einzeln mit Trypsin über Nacht verdaut. Die Proben wurden nach Extraktion aus dem Gel auf dem Q-TOF gemessen (Arbeitsablauf siehe Abbildung 3.4, Seite 38). Nach der Datenprozessierung im Mascot Distiller wurde eine Suche mit Mascot Server in der Swissprot-Datenbank (Stand August 2009) durchgeführt. Dabei waren für die Auswertung die Optionen „*bold red*“, ein minimaler Peptidscore von 15 und das Standard-Scoring ausgewählt.

### 5.2 Ergebnisse

#### 5.2.1 Identifizierte Interaktionspartner von mPER2

Wie in den Abbildungen 5.1 bis 5.3 auf den Seiten 56 bis 58 dargestellt ist, wurden bei der Analyse des Immunopräzipitates von mPER2 Proteine gefunden, welche bekannte Bestandteile der circadianen Uhr darstellen. In Bezug auf Abschnitt 1.6 handelt es sich dabei um die Proteine mPER1 und mPER2, sowie mCRY1 und mCRY2, die Isoformen  $\delta$  und  $\epsilon$  der Casein-Kinase I, die Casein-Kinase II und das F-Box Protein 11 (Spalte 1. Abbildung 5.1). Daneben wurden mitochondriale Proteine (Spalte 2. Abbildung 5.1), Proteine des Endoplasmatischen Retikulum (Spalte 3. Abbildung 5.2), Stressproteine (Spalte 4. Abbildung 5.2), Teile der zur Immunopräzipitation verwendeten Antikörper (Spalte 5. Abbildung 5.3), sowie Proteine des Zytoskelettes (Spalte 6. Abbildung 5.3) gefunden. Die Zahlen in der Tabelle geben dabei die Mascot Scoring-Ergebnisse für das Protein in der jeweiligen Gelbande an.

Während der Versuche mit  $^{15}\text{N}$ -Labeling im Abschnitt 9 (ab Seite 125) wurden auf Höhe der mPER2-Bande weitere Proteine identifiziert, welche im Immunopräzipitat vorhanden waren. Die Suchen in der Proteindatenbank wurden dabei mit den gleichen Parametern und einer Swissprot-Datenbank (Stand November 2011) durchgeführt. Dabei wurden zusätzlich folgende humane Proteine identifiziert: AP-3 complex subunit delta-1, ATP-dependent RNA helicase A, Cingulin, Cytospin-A, Desmoglein-2, Eukaryotic

## 5 Identifizierung von Interaktionspartnern des Proteins mPER2

Bande	1.									2.		
	Period circadian protein homolog 2 OS:Mus	Period circadian protein homolog 1 OS:Homo	Cryptochrome-1 OS:Homo	Cryptochrome-2 OS:Homo	Casein kinase I isoform delta OS:Homo	Casein kinase I isoform epsilon OS:Homo	Casein kinase II subunit beta OS:Homo	F-box/WD repeat-containing protein 11		ATPase family AAA domain-containing protein 3A OS:Homo	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS:Homo	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5 OS:Homo
	164	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	2023	69	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	668	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	115	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	308	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	71	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	263	0	0	79	0	0	0	0		66	0	0
	401	0	0	893	0	0	0	0		0	0	0
	150	0	1079	368	0	0	0	0		122	0	0
	0	0	385	0	0	0	0	305		0	0	0
	0	0	59	0	0	0	0	459		0	180	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	688	877	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	93	121	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	152
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	111
	0	0	0	0	0	0	60	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0

Abbildung 5.1 – Identifizierte Interaktionspartner von mPer2 Teil 1/3

[illegible]

**Abbildung 5.2** – Identifizierte Interaktionspartner von mPer2 Teil 2/3

## 5 Identifizierung von Interaktionspartnern des Proteins mPER2

[illegible]

**Abbildung 5.3** – Identifizierte Interaktionspartner von mPer2 Teil 3/3

translation initiation factor 5B, Insulin receptor substrate 4, La-related protein 1, Leucine zipper protein 1, LIM and calponin homology domains-containing protein 1, LIM domain only protein 7, Myb-binding protein 1A, Myosin phosphatase Rho-interacting protein, Myosin-VI, Myosin-9, Myosin-10, Myosin-14, Neurabin-1, Pleckstrin homology-like domain family B member 2, Protein flightless-1 homolog, Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A, Scaffold attachment factor B1, Sperm-specific antigen 2 homolog, Splicing factor 3B subunit 1, Supervillin, Tight junction protein ZO-2, Ubiquitin, Ubiquitin-60S ribosomal protein L40, Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats.

### 5.2.2 Verkürzte Versionen von mPER1 und mPER2

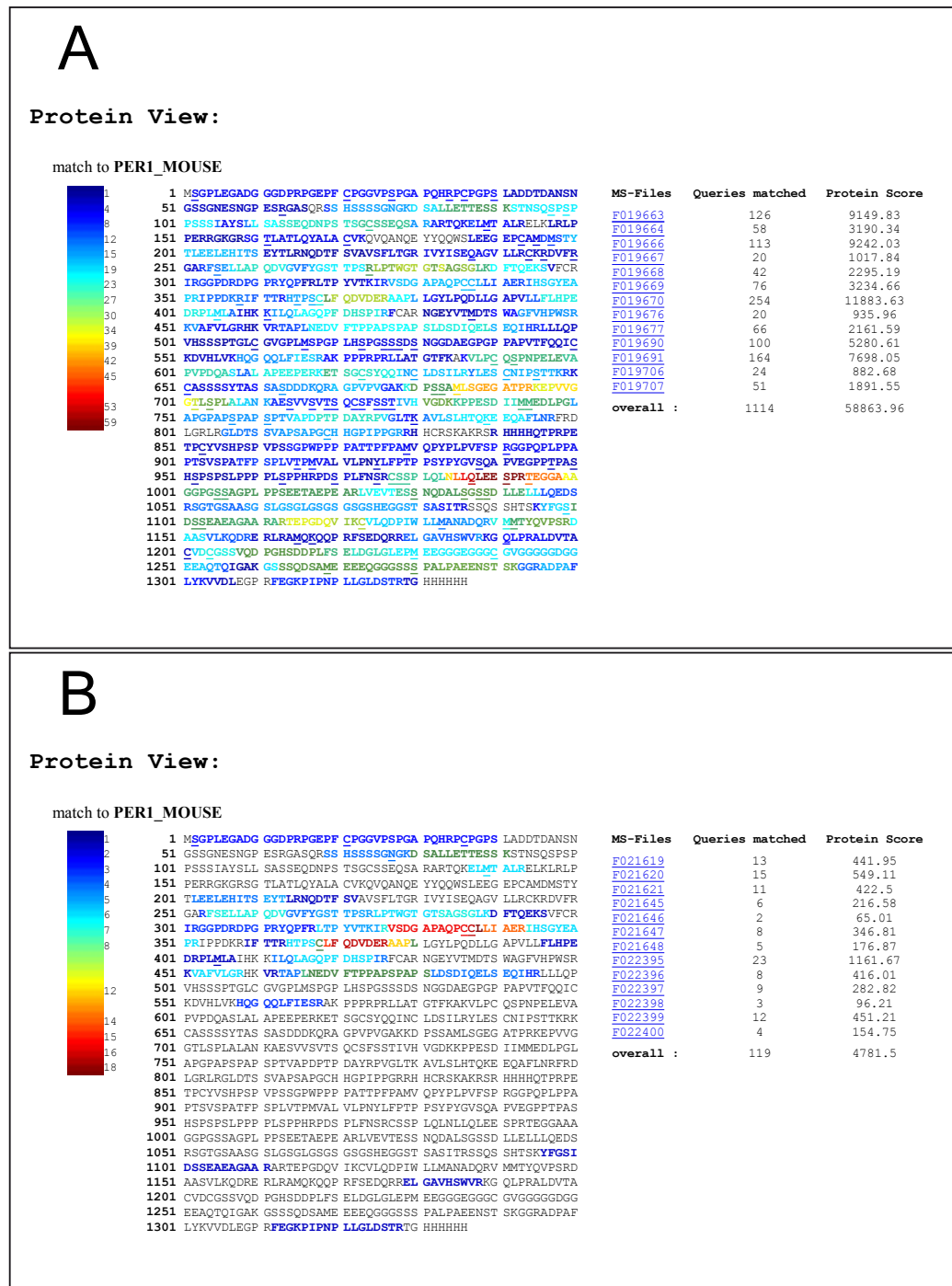
Bei den Versuchen zu den Interaktionspartnern von mPER2 wurde mPER2 bei der Analyse der Gelbanden nicht nur im Bereich der Banden 2 bis 5 (ca. 135 kDa) identifiziert; Peptide des Proteins fanden sich außerdem noch im Bereich der Banden 8 bis 11 (ca. 67 kDa), siehe Abbildung 5.1 auf Seite 56. Bei der Untersuchung von Immunopräzipitaten von mPER1 war der gleiche Effekt zu erkennen.

Der Fund weiterer Peptide der Period-Proteine kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte es sich um Artefakte aus der Probenvorbereitung handeln, welche zum Beispiel durch partielle Hydrolyse der Proteine entstehen könnten. Außerdem wäre ein Abbau des N- oder C-Terminus in der Zelle denkbar. Um diese Ursachen für die Bildung der kurzen Proteinvariante auszuschließen, wurde daher versucht, die kurzen Varianten der Period-Proteine mit einer möglichst hohen Sequenzabdeckung zu analysieren. Dafür wurden die Gelbanden im Bereich von ca. 67 kDa einer Analyse mittels Multiproteaseverdau unterzogen, welche auch bei den „normalen“ Varianten von mPER1 und mPER2 durchgeführt wurde. Dabei kamen am Q-TOF neben der standardmäßig verwendeten datenabhängigen MS2-Fragmentierung auch Einschlusslisten von identifizierten Peptiden eines Trypsinverdaus der „normalen“ Proteinvariante zum Einsatz.

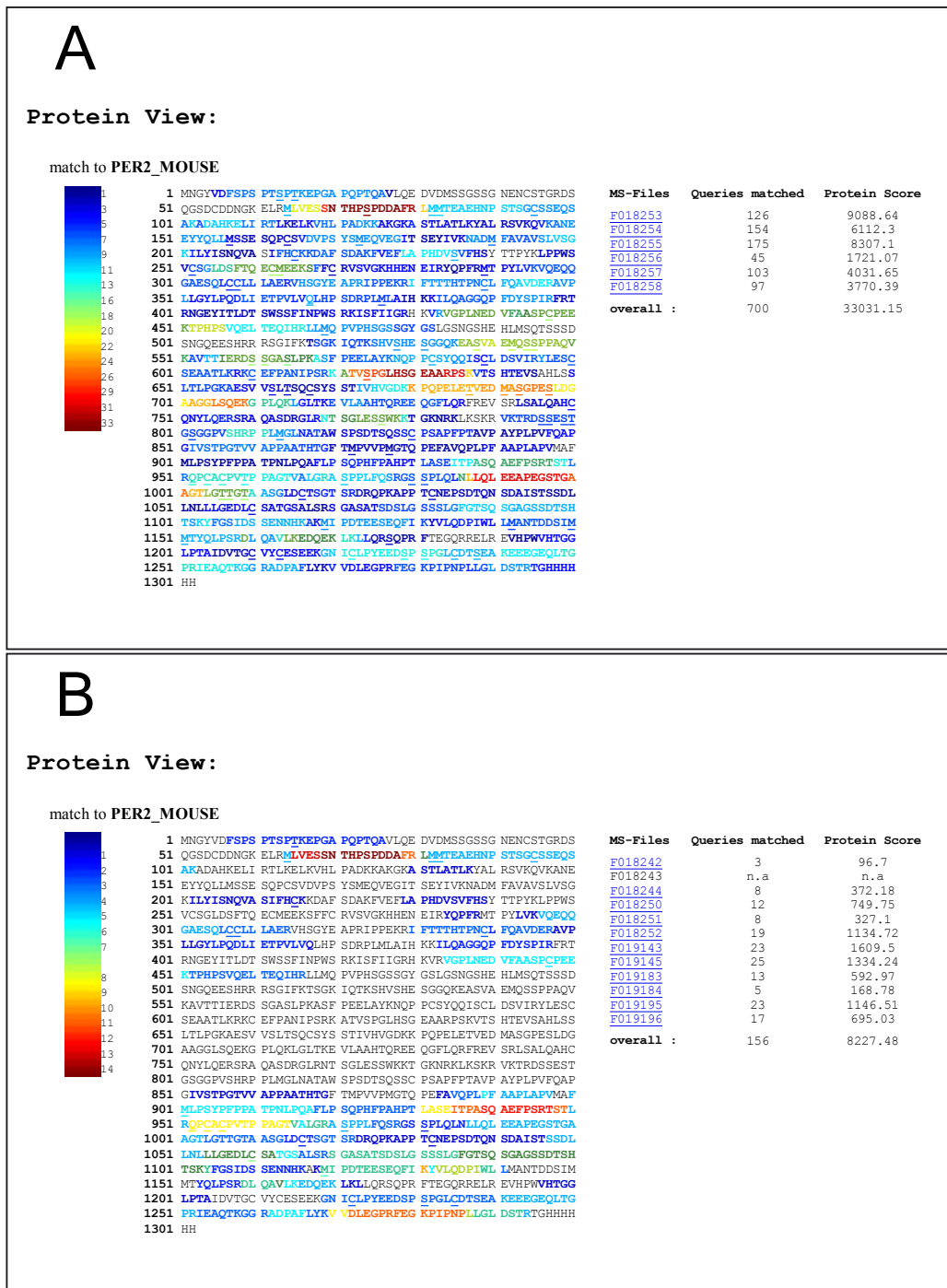
Für beide Varianten der Proteine wurden die Daten der Messungen in Pepview zusammengeführt. Es wurde ein Mascot-Score von mindestens 20 verwendet. Wie in Abbildung 5.4 (Seite 60) für mPER1 und in Abbildung 5.5 (Seite 61) für mPER2 ersichtlich ist, lassen sich bei den „verkürzten“ Varianten der Proteine Peptide im N-terminalen und C-terminalen Bereich des Proteins identifizieren. Im mittleren Bereich der Proteinsequenz hingegen finden sich keine Peptide. Die Peptide, die in den N- und C-terminalen Bereichen der kurzen Varianten der Proteine ermittelt wurden, hatten hohe Mascot-Scores. Dies traf auch auf die Peptide im C-terminalen Bereich der kurzen Variante von mPER1 (Teil B von Abbildung 5.4) zu. Die dort identifizierten Peptide hatten einen Mascot-Score von 30 bis 100 und zeigten die gleichen Fragmentspektren wie in den langen Varianten. Dies ist ein Indiz dafür, dass die dort identifizierten Peptide tatsächlich zu einer verkürzten Variante der Period-Proteine gehören.

Diese alternative Variante der Period-Proteine kann in der Zelle durch verschiedene Mechanismen gebildet werden. Denkbar wären zum Beispiel ein alternatives Splicing des Proteins, andere Modifikationen auf mRNA-Ebene oder Prozessierung der Period-Proteine auf Proteinebene. Die nachgewiesenen Abschnitte von mPER2 passen allerdings

## 5 Identifizierung von Interaktionspartnern des Proteins mPER2



**Abbildung 5.4** – Pepview-Übersicht der Varianten von mPER1, Mascot-Score  $\geq 20$ ; der kurzen Variante (B) fehlen Peptide im mittleren Bereich des Proteins, welche bei der normalen Variante (A) identifizierbar sind.



A | mPER2 normale Variante

B | mPER2 kurze Variante

**Abbildung 5.5** – Pepview-Übersicht der Varianten von mPER2, Mascot-Score  $\geq 20$ ; der kurzen Variante (B) fehlen Peptide im mittleren Bereich des Proteins, welche bei der normalen Variante (A) identifizierbar sind.

nicht zu bekannten Introns und Exons.

Da sich die kurzen Versionen der Period-Proteine auf der Höhe der Bande des Proteins Cryptochrom 2 auf dem Polyacrylamid-Gel finden und in einer geringeren Konzentration als die vollständige Variante vorliegen, gestaltet sich die Analyse der kurzen Variante schwierig.

### 5.3 Diskussion

Bei der Analyse der Interaktionspartner von mPER2 wurden bekannte Interaktionspartner des Proteins identifiziert. Für eine umfassendere Analytik der Interaktionspartner wären weitere Immunopräzipitationen verschiedener Proteine des circadianen Systems sinnvoll, um so möglichst viele Komponenten, die mit diesem System interagieren, zu identifizieren. Da bei den verschiedenen Immunopräzipitationen zum Teil deutliche Unterschiede in den Interaktionspartnern ermittelt wurden, wäre außerdem eine Durchführung der Versuche mit mehreren Replikaten sinnvoll.

Zur Untersuchung der kurzen Proteinvarianten der Period-Proteine wäre auf LC-MS Ebene zudem Messungen auch mit einem hochauflösenden ETD-Massenspektrometer von Vorteil, um die Aminosäuresequenz der kurzen Variante möglichst vollständig zu erfassen. Möglicherweise wäre dafür weitere Fraktionierungsschritte sinnvoll, um die Trennung der Proteine Period 2 und Cryptochrom 2 zu erreichen. Außerdem müsste mit cDNA Untersuchungen überprüft werden, ob es sich bei den verkürzten mPER-Varianten um Splicing-Varianten handelt.



# 6 Qualitative Analyse der Phosphorylierung und anderer posttranslationaler Modifikationen der mPER Proteine

## 6.1 Einleitung

### 6.1.1 MS-Analytik von Phosphopeptiden

Die Analyse von Phosphopeptiden weist einige Besonderheiten im Vergleich zur Analyse unmodifizierter Peptide durch massenspektrometrische Methoden auf. So tritt bei CID-Fragmentspektren von Phosphopeptiden, welche Phosphoserin und Phosphothreonin enthalten, in vielen Fällen ein starker Neutralverlust (NL) von  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , entsprechend einer Masse von 97,9768 Da, auf. Die Intensität des Neutralverlustes hängt von der Art des Massenanalysators (stärkeres Auftreten bei Ionenfallen), der Peptidsequenz (Martin et al., 2005) und der Peptidladung ab. So weisen zweifach geladene Peptidionen oftmals einen stärkeren Neutralverlust als dreifach geladene Peptidionen auf (DeGnore und Qin, 1998; Jin et al., 2004). Der Neutralverlust ist dabei von der Existenz mobiler Protonen am Peptidion abhängig. So zeigen Peptidionen mit vollständig mobilen Protonen einen wesentlich schwächeren Neutralverlust als solche mit nur partiell mobilen Protonen (Martin et al., 2005). Der Neutralverlust stellt bei Fragmentspektren oftmals das stärkste Signal dar (Tholey et al., 1999), während die anderen Fragmentationen in diesen Spektren oftmals nur ein schwaches Signal ergeben oder nicht zu beobachten sind. Grund dafür ist, dass die dem Peptid zugeführte Kollisionsenergie hauptsächlich für den Bindungsbruch am Phosphatrest verwendet wird und daher nur wenige Bindungsbrüche am Peptid-Backbone stattfinden. Dies führt dazu, dass man zwar erkennen kann, dass das Peptid phosphoryliert vorliegt, jedoch sind die Sequenzinformationen sehr schlecht und eine genaue Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle im Peptid fällt schwer oder ist gar unmöglich. Bei mehrfach phosphorylierten Peptiden verstärkt sich dieser Effekt durch das Auftreten mehrere Neutralverluste noch weiter. Der Neutralverlust der Phosphatgruppe kann aufgrund seiner typischen Masse auch für die Suche nach Phosphopeptiden in komplexen Mischungen genutzt werden (Huddleston et al., 1993; Schlosser et al., 2001). Bei der Messung von Phosphopeptiden in Ionenfallen kann man Aufgrund des Geräteaufbaus einen prominent auftretenden Neutralverlust erneut isolieren und nochmals mittels CID fragmentieren ( $\text{MS}^3$ ) (Jin et al., 2004; Zumwalt et al., 2003). Eine Variation dieser Methode ist *Multi stage activation* (MSA), welches das  $\text{MS}^2$ - und  $\text{MS}^3$ -Spektrum kombiniert indem der Neutralverlust ohne weiter Isolierung in der Ionenfalle erneut zur Fragmentierung aktiviert wird (Schroeder et al., 2004). Trotz  $\text{MS}^3$  oder MSA fällt die

Lokalisierung von Phosphorylierungsstellen mittels CID aufgrund schlechter Fragmentenspektren oftmals schwer. Als alternative Fragmentierungsmethoden zu CID bieten sich daher *Electron capture dissociation* (ECD) (Zubarev et al., 2000) und *Electron transfer dissociation* (ETD) (Syka et al., 2004) an. Diese beiden nicht ergodischen Fragmentierungsvarianten führen nicht zu einem Neutralverlust an der Phosphatgruppe. Die Spaltung am Peptid-Backbone findet zwischen dem Stickstoffatom und dem C $\alpha$ -Atom der Peptidbindung statt, was zur Bildung von *c*- und *z*-Ionen führt. ECD und ETD führen bei einer Peptidladung von 3+ oder höher zu sehr guten Fragmentenspektren, bei zweifach geladenen Ionen ist die Fragmentierung schlechter (Good et al., 2007; Molina et al., 2008). Die Phosphorylierung eines Peptids führt außerdem zu einer negativen Beeinflussung des Fragmentierungsverhaltens bei ECD und ETD, siehe auch Abschnitt 6.1.2. Im Vergleich von CID mit ECD bzw. ETD scheint CID durch seine höhere Geschwindigkeit besser für die Phosphopeptididentifikation geeignet zu sein, während ECD und ETD sich besser für die Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle eignen (Stingl et al., 2006; Sweet et al., 2009). Für die qualitative Bestimmung der Phosphorylierung wurden die Period-Proteine daher sowohl mit der Ionenfalle und ETD als auch mit dem QTOF und CID gemessen.

### 6.1.2 ETD-Fragmentierung von multiphosphorylierten Peptiden

Bei CID geht durch den Neutralverlust von Phosphorsäure viel Fragmentierungsenergie verloren, was in vielen Fällen zu wenigen Fragmentionen mit Sequenzinformation führt. Durch den Einsatz von ETD erhält man daher in vielen Fällen, vor allem bei Precursor-Ionen mit einer Ladung größer 2+ ein Fragmentenspektrum mit einer sehr guten Sequenzabdeckung. Es wurde jedoch von Creese und Cooper (2008) beim Einsatz von ECD beobachtet, dass mehrfach phosphorylierte Peptide auch bei ECD nur ein Fragmentenspektrum mit geringer Sequenzinformation liefern. Dies liegt vermutlich an der Bildung von intramolekularen Ionenbindungen zwischen den positiv geladen basischen Aminosäuren des Peptids und den negativ geladenen Phosphatgruppen. Das Peptid-Backbone wird zwar durch den radikalischen Mechanismus gespalten, die Fragmente trennen sich aber nicht voneinander. Dies ist auch bei Peptiden mit nur zwei positiven Ladungen bei der Verwendung von ETD der Fall. Dieses Phänomen tritt sowohl bei ECD, als auch bei ETD auf. Daher ist im Anschluss an die Elektronentransferreaktion zudem eine schwache CID-Reaktion vonnöten, um die Fragmente zu trennen (ETcaD), (Swaney et al., 2007). Da bei den untersuchten Period-Proteinen relativ viele multiphosphorylierte Peptide auftreten, ist es daher notwendig, ETcaD zu verwenden, um bei diesen Peptiden Fragmentenspektren mit guter Sequenzinformation zu erreichen. Diese werden für die genaue Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen benötigt. Die verwendete ETD-Ionenfalle von Agilent bietet in der Software daher die Option „*Smart Decomposition*“ an, welches dieser Aktivierung entspricht. Diese Option kann entweder nur für zweifach geladene Peptide verwendet werden oder sie erfolgt automatisch. Um diese Aktivierung des ladungsreduzierten Precursor-Ions durchzuführen, muss das System jedoch den Ladungszustand des Precursors erkennen. Aufgrund der geringen Auflösung der Ionenfalle gelingt dies leider nicht zuverlässig. Somit generiert das System,

je nach Erfolg der Ladungserkennung, sowohl ETD-Fragmentspektren mit Sequenzinformation als auch ETD-Fragmentspektren, die hauptsächlich aus dem ladungsreduzierten Precursor bestehen. Dadurch ergibt sich für die mehrfach phosphorylierten Peptide keine zuverlässige Fragmentierung mit ETD. Folglich wurden mit ETD entsprechend wenige mehrfach phosphorylierte Peptide identifiziert. Die Verwendung eines hochauflösenden ETD-Massenspektrometers würde zu einer wesentlich besseren Identifizierung mehrfach phosphorylierter Peptide führen.

### 6.1.3 Phosphorylierung der Period-Proteine

Nach dem aktuellen Stand vom Oktober 2011 sind in der UniProt-Datenbank (Apweiler et al., 2011) für mPER1 und mPER2 der Maus keine bzw. sechzehn experimentell ermittelten Phosphorylierungsstellen verfügbar. Die bekannten publizierten Phosphorylierungsstellen für die Proteine mPER1 und mPER2 (Maus) aus der UniProt-Datenbank und von [www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org) sind in Tabelle 6.1 auf Seite 66 zusammengestellt.

## 6.2 Material und Methoden

### 6.2.1 Probenvorbereitung

Die Immunopräzipitate von mPER1 und mPER2 aus HEK293-Zellen wurden von Sabrina Wendt, Astrid Grudziecki und Jens Vanselow (AG Kramer, Institut für Medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin), wie in Abschnitt 3.4 auf Seite 31 beschrieben, vorbereitet. Die Proben befanden sich nach der Prozedur in jeweils ca. 60 µl LDS-Proben-Puffer von Invitrogen. Anschließend wurden sie reduziert und alkyliert und eine SDS-PAGE durchgeführt. Die den Proteinen mPER1 und mPER2 entsprechenden Gelbanden wurden entfärbt und getrocknet. Die detaillierten Schritte der Probenvorbereitung sind in Abschnitt 3.5 ab Seite 33 im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Die so vorbereiteten Proben wurden mit den Proteasen Elastase und Trypsin bei 37 °C über Nacht bzw. mit Thermolysin bei 60 °C für 3 h verdaut. Zweck des Multiprotease-verdaus ist es, eine möglichst hohe Sequenzabdeckung an den Proteinen zu erreichen, um möglichst alle Phosphorylierungen erfassen zu können (Schlosser et al., 2005).

### 6.2.2 Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$

Die Anreicherung der Phosphopeptide von mPER1 und mPER2 wurde wie in Kapitel 4 ab Seite 45 beschrieben optimiert. Für die Experimente zur qualitativen Analyse der Phosphorylierung wurden die in Abschnitt 3.9 beschriebenen Bedingungen für die Phosphopeptidanreicherung mittels  $\text{TiO}_2$  verwendet.

### 6.2.3 LC-MS Methodik

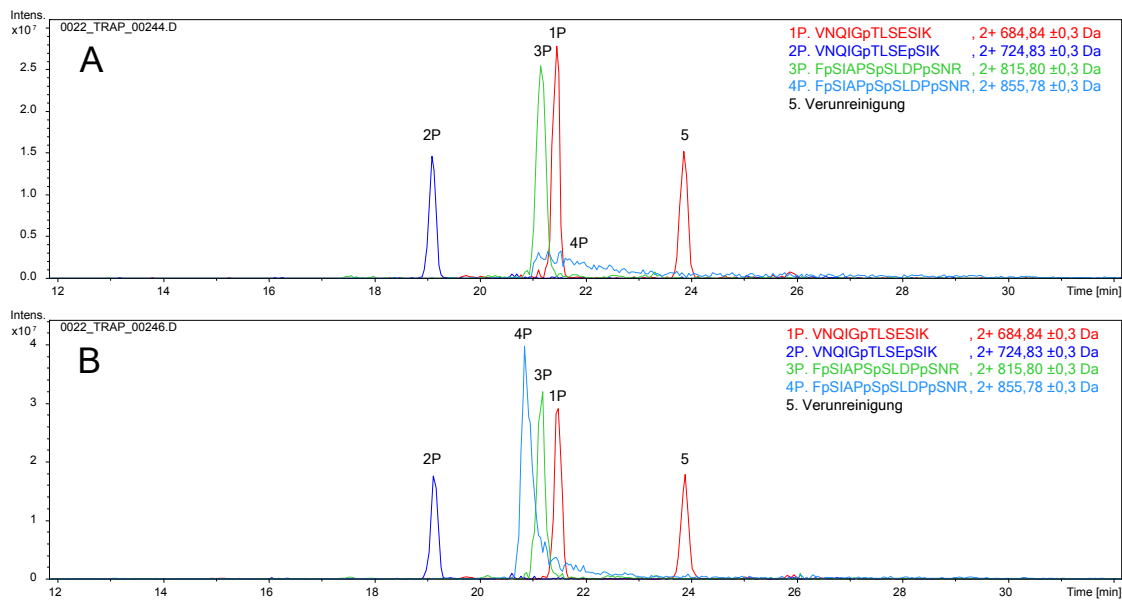
Für die qualitative Analyse und Bestimmung der phosphorylierten Aminosäuren von mPER1 und mPER2 wurde der im Kapitel Material und Methoden in Abschnitt 3.9

## 6 Qualitative Analyse der Phosphorylierung und anderer PTM der mPER Proteine

mPER1		mPER2	
S-661	(a)	[S-8,S-10,T-12,S-13,T-15] 2×P	(1)
S-663	(a)	S-53	(2)
S-704	(b,c,d)	[S-69,T-71] 1×P	(3)
S-714	(a)	S-74	(1,4)
		T-84	(3)
		[S-91,T-92] 1×P	(3)
		S-523	(1)
		S-525	(3)
		S-528	(3)
		S-531	(3)
		S-538	(3)
		S-544	(1,3)
		T-554	(3)
		T-618 [T-622,S-642] 2×P	(3)
		S-624	(1)
		S-659	(1)
		S-662	(1)
		[S-693, S-697] 1×P	(1,3,4,5)
		S-706	(3)
		S-758	(3)
		S-763	(1,3)
		S-770	(3)
		S-776	(1,3)
		[T-793,S-796,S-797,S-799,T-800,S-802] 2×P	(3)
		S-807	(3)
		S-858	(3)
		[T-866,T-868] 1×P	(3)
		S-933	(3)
		S-939	(3)
		S-959	(1)
		T-964	(3)
		S-971	(1,3)
		S-980	(1)
		S-981	(1)
		[S-997,S-998] 1×P	(1,3)
		S-1126	(3)
		S-1231	(1)
		[T-1237,S-1238] 1×P	(3)
(a)	(Takano et al., 2004)	(1)	(Vanselow et al., 2006)
(b)	(Wisniewski et al., 2010)	(2)	(Tsuchiya et al., 2009)
(c)	(Yu et al., 2011)	(3)	(Schlosser et al., 2005)
(d)	(Huttlin et al., 2010)	(4)	(Villen et al., 2007)
		(5)	(Huttlin et al., 2010)

**Tabelle 6.1** – Publierte Phosphorylierungsstellen von murinem mPER1 und mPER2 (Stand Oktober 2011); P ≐ Phosphoryliert

auf Seite 37 beschriebene Arbeitsablauf verwendet, siehe auch Abbildung 3.6 auf Seite 41. Die Verwendung von 100 mM Citrat-Puffer bei der Elution der Phosphopeptide von der  $\text{TiO}_2$ -Säule bietet dabei eine erhöhte Recovery von mehrfach phosphorylierten Peptiden. Diese würden ansonsten mit immobilisierten Eisenionen auf der  $\text{TiO}_2$ -Säule sowie der  $\text{C}_{18}$ -Säule bei der LC-MS Messung interagieren und an diese zum Teil irreversibel gebunden werden (Seidler et al., 2011). Die Vorteile der Citrat-Zugabe im Vergleich zu einer herkömmlichen Injektion bei der LC-MS Messung sind in Abbildung 6.1 dargestellt. Wie in Teil A der Abbildung zu erkennen ist, wird das 4-fach phosphorylierte Peptid FpSIAPpSpSLDPpSNR bei der Injektion unter Standardbedingungen nur schlecht und als breiter Peak von der  $\text{C}_{18}$ -Säule eluiert. Bei der Injektion mit 100 mM Zitronensäure hingegen erfolgt eine gute Elution des Peptids von der Säule (Teil B). Daher wurde bei der Ermittlung der Phosphorylierungsstellen von mPER1 und mPER2 routinemäßig die Probe vor der LC-MS-Messung mit 100 mM Zitronensäure bzw. Citrat-Puffer versetzt.



- A | 1-4 × phosphorylierte Peptides des 7P-Mix, Injektion mit 0,1 % FA  
 B | 1-4 × phosphorylierte Peptides des 7P-Mix, Injektion mit 100 mMCA

**Abbildung 6.1** – Vergleich der Chromatographie der phosphorylierten Peptide VNQIGpTLSESIK 1×P ( $m/z = 684,84$ ), VNQIGpTLSEpSIK 2×P ( $m/z = 724,83$ ), FpSIAPSpSLDPpSNR 3×P ( $m/z = 815,80$ ) und FpSIAPpSpSLDPpSNR 4×P ( $m/z = 855,78$ ) des 7P-Mix bei der LC-MS-Analytik über  $\text{C}_{18}$ -Säulenmaterial: Es ist eine bessere Recovery und Peakform des 4-fach phosphorylierten Phosphopeptids bei der Injektion mit 100 mM Zitronensäure zu beobachten.

#### 6.2.4 Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte wie im Abschnitt 3.10.4 auf Seite 42 beschrieben. Für die Kartierung (*Mapping*) der Phosphorylierungsstellen wurden Peptide mit einem Mascot-Score von unter 15 verworfen. Bei höheren Scores wurde der Ladungszustand des Precursor-Ions überprüft und die Qualität des MS<sup>2</sup>-Spektrums manuell validiert, um falsch positive Resultate zu reduzieren. Bei multiphosphorylierten Proteinen wurden außerdem die Extracted-Ion-Chromatogramme ( $\pm 20$  ppm) der theoretischen Massen aus den Rohdaten extrahiert. Bei mehrfach phosphorylierten Peptiden treten außerdem häufig Positionsisomere auf, d.h. das Peptid hat z.B. eine Einfach-Phosphorylierung, welche an verschiedenen Serinen lokalisiert ist. Diese Positionsisomere lassen sich zum Teil über die C<sub>18</sub>-Säule chromatographisch auftrennen. Wurden im Extracted-Ion-Chromatogramm diese chromatographisch aufgelösten Phosphoisomere erkannt, dann wurden mit dem Mascot Distiller soweit möglich MGF-Dateien für den Peakbereich der einzelnen Isomere erstellt und diese gezielt analysiert. Bei den Messungen mit dem Q-TOF wurde zusätzlich eine Suche mit PHOSM (Schlosser et al., 2007) durchgeführt, um die Phosphorylierungsstellen möglichst genau zu lokalisieren.

### 6.3 Ergebnisse

Durch den verwendeten Arbeitsablauf und den Verdau mit den Proteasen Elastase, Trypsin und Thermolysin wurde sowohl bei mPER1, siehe Abbildung 6.2 auf Seite 69, als auch bei mPER2, siehe Abbildung 6.4 auf Seite 71 eine hohe Sequenzabdeckung der Proteine bezüglich der identifizierten Peptide erreicht (mPER1 >97 %, mPER2 >94 %). In den Abbildungen sind die erfassten Sequenzbereiche der Proteine im Einbuchstabencode rot markiert, der V5-Tag ist einfach und der Histidin-Tag zweifach unterstrichen.

#### 6.3.1 Phosphorylierung von mPER1

Mit dem verwendeten Verfahren des Multiproteaseverdaus, kombiniert mit der Phosphopeptidanreicherung mittels TiO<sub>2</sub>, konnten bei mPER1 30 Phosphorylierungsstellen lokalisiert werden (**rote** Serine und Threonine). Bei 3 Phosphorylierungsstellen konnte die Phosphorylierung nicht eindeutig auf eine Aminosäure lokalisiert werden (**blaue** Serine und Threonine). Die identifizierten Phosphorylierungsstellen sind in Abbildung 6.3 auf Seite 70 abgebildet.

#### 6.3.2 Phosphorylierung von mPER2

Bei mPER2 konnten 42 Phosphorylierungsstellen an Serinen und Threoninen sowie eine Tyrosinphosphorylierung lokalisiert werden (**rote** Serine, Threonine und Tyrosin). Bei 3 Phosphorylierungsstellen konnte die Phosphorylierung nicht eindeutig auf eine Aminosäure lokalisiert werden (**blaue** Serine und Threonine). Die identifizierten Phosphorylierungsstellen sind in Abbildung 6.5 auf Seite 72 abgebildet.

1	MSGPLEGADG	GGDPRPGEPF	CPGGVPSPGA	PQHRPCPGPS	LADDTDANSN
51	GSSGNESNGP	ESRGASQRSS	ESRGASQRSS	SALLETTESS	KSTNSQSPSP
101	PSSSIAYSL	SASSEQDNPS	TSGCSSEQSA	RARTQKELMT	ALRELKLRLP
151	PERRGKGRSG	TLATLQYALA	CVKQVQANQE	YYQWSLEEG	EPCAMDSTY
201	TLEELEHITS	EYTLRNQDTF	SVAVSFLTGR	IVYISEQAGV	LLRCKRDVFR
251	GARFSELLAP	QDVGVFYGST	TPSRLPTWGT	GTSAGSGLKD	FTQEKSVMFCR
301	IRGGPDRDPG	PRYQPFRLTP	YVTKIRVSDG	APAQPCCLLI	AERIHSGYEA
351	PRIPDPKRIF	TTRHTPSCLF	QDVDERAAPL	LGYPQDLLG	APVLLFLHPE
401	DRPLMLAIHK	KILQLAGQPF	DHSPIRF <del>CAR</del>	NGEYVTMDTS	WAGFVHPWSR
451	KVAFVLGRHK	VRTAPLNEDV	FTPPAPSPAP	SLDSDIQELS	EQIHRLLLP
501	VHSSSPTGLC	GVGPLMSPGP	LHSPGSSSDS	NGGDAEGPGP	PAPVTFQQIC
551	KDVHLVKHQG	QQLFIESRAK	PPPRPRLAT	GTFKAKVLPC	QSPNPELEVA
601	PVPDQASLAL	APEEPERKET	SGCSYQQINC	LDSILRYLES	CNIPSTTKRK
651	CASSSSYTAS	SASDDDKQRA	GPVPVGAKKD	PSSAMLSGEG	ATPRKEPVVG
701	GTLSPALAN	KAESVVSPTS	QCSFSSTIVH	VGDKKPPESD	IIMMEDLPGL
751	APGPAPSPAP	SPTVAPDPTP	DAYRPVGLTK	AVLSLHTQKE	EQAFNLNFRD
801	LGRLRGLDTS	SVAPSAPGCH	HGPIPPGRRH	HCRSKAKRSR	HHHHQTPRPE
851	TPCYVSHPS	VPSSGPWPPP	PATTPFPAMV	QPYPLPVFSP	RGGPQPLPPA
901	PTSVSPATFP	SPLVTPMVAL	VLPNYLFPTP	PSYPYGVSSA	PVEGPPTPAS
951	HSPSPSLPPP	PLSPPHRPDS	PLFNSRCSSP	LQLNLLQLEE	SPRTEGGAAA
1001	GGPGSSAGPL	PPSEETAEP	ARLVEVTESS	NQDALSGSSD	LLELLLQEDS
1051	RSGTGSAASG	SLGSGLGSGS	SGSGHEGGST	SASITRSSQS	SHTSKYFGSI
1101	DSSEAEAGAA	RARTEPGDQV	IKCVLQDPIW	LLMANADQRV	MMTYQVPSRD
1151	AASVLKQDRE	RLRAMQKQQP	RFSEDQRREL	GAVHSWVRKG	QLPRALDVTA
1201	CVDCGSSVQD	PGHSDDPLFS	ELDGLGLEPM	EEGGGEGGGC	GVGGGGGDGG
1251	EEAQTQIGAK	GSSSQDSAME	EEEQGGGSSS	PALPAEENST	SKGGRADPAF
1301	LYKVVDLEGP	RFEGKPIPNP	LLGLDSTRTG	<u>HHHHH</u>	

**Abbildung 6.2** – Sequenzabdeckung von murinem mPER1, Verdau mit Trypsin, Elastase, Thermolysin, minimaler Mascot Score  $\geq 15$ ; **Rot**: Identifizierte Sequenzbereiche; **Schwarz**: Nicht identifizierte Sequenzbereiche, Einfach unterstrichen: V5-Tag; Doppelt unterstrichen: Histidin-Tag

## 6 Qualitative Analyse der Phosphorylierung und anderer PTM der mPER Proteine

1	MSGPLEGADG	GGDPRPGEPF	CPGGVPSPGA	PQHRPCPGPS	LADDDTDANSN
51	GSSGNESNGP	ESRGASQRSS	ESRGASQRSS	SALLETTES	KSTNSQSPSP
101	PSSSIAYSL	SASSEQDNPS	TSGCSSEQSA	RARTQKELMT	ALRELKLRLP
151	PERRGKGRSG	TLATLQYALA	CVKQVQANQE	YYQWSLEEG	EPCAMDSTY
201	TLEELEHITS	EYTLRNQDTF	SVAVSFLTGR	IVYISEQAGV	LLRCKRDVFR
251	GARFSELLAP	QDVGVFYGST	TPSRLPTWGT	GTSAGSGLKD	FTQEKSVMFCR
301	IRGGPDRDPG	PRYQPFRLTP	YVTKIRVSDG	APAQPCCLLI	AERIHSGYEA
351	PRIPDPKRIF	TTRHTPSCLF	QDVDERAAPL	LGYPQDLLG	APVLLFLHPE
401	DRPLMLAIHK	KILQLAGQPF	DHSPIRFCAR	NGEYVTMDTS	WAGFVHPWSR
451	KVAFVLGRHK	VRTAPLNEDV	FTPPAPSPAP	SLDSIDIQELS	EQIHRLLLQP
501	VHSSSPTGLC	GVGPLMSPGP	LHSPGSSSDS	NGGDAEGPGP	PAPVTFQQIC
551	KDVHLVKHQG	QQLFIESRAK	PPPRPRLAT	GTFKAKVLPC	QSPNPELEVA
601	PVPDQASLAL	APEEPERKET	SGCSYQQINC	LDSILRYLES	CNIPSTTKRK
651	CASSSYTAS	SASDDDKQRA	GPVPVGAKKD	PSSAMLSGEG	ATPRKEPVVG
701	GTLSPALAN	KAESVVSVTS	QCSFSSTIVH	VGDKKPPESD	IIMMEDLPGL
751	APGPAPSPAP	SPTVAPDPTP	DAYRPVGLTK	AVLSLHTQKE	EQAFNLNRFRD
801	LGRLRGLDTS	SVAPSAPGCH	HGPIPPGRRH	HCRSKAKRSR	HHHHQTPRPE
851	TPCYVSHPS	VPSSGPWPPP	PATTPFPAMV	QPYPLPVFSP	RGGPQPLPPA
901	PTSVSPATFP	SPLVTPMVAL	VLPNYLFPTP	PSYPYGVSSQA	PVEGPPTPAS
951	HSPSPSLPPP	PLSPPHRPDS	PLFNSRCS	LQLNLLQLEE	SPRTEGGAAA
1001	GGPGSSAGPL	PPSEETAEP	ARLVEVTESS	NQDALSGSSD	LLELLLQEDS
1051	RSGTGSAASG	SLGSGLGSGS	SGSGHEGGST	SASITRSSQS	SHTSKYFGSI
1101	DSEAEAGAA	RARTEPGDQV	IKCVLQDPIW	LLMANADQRV	MMTYQVPSRD
1151	AASVLKQDRE	RLRAMQKQQP	RFSEDQRREL	GAVHSWVRKG	QLPRALDVTA
1201	CVDCGSSVQD	PGHSDDDLFS	ELDGLGLEPM	EEGGGEGGGC	GVGGGGGDGG
1251	EEAQTQIGAK	GSSSQDSAME	EEEQGGGSS	PALPAEENST	SKGGRADPAF
1301	LYKVVDLEGP	RFEGKPIPNP	LLGLDSTRTG	HHHHH	

**Abbildung 6.3** – Identifizierte Phosphorylierungsstellen von murinem mPER1, minimaler Mascot Score  $\geq 15$ ; **Rot**: lokalisierte Phosphorylierungsstelle; **Blau**: nicht exakt lokalisierbare Phosphorylierungsstelle



1	MNGYVDFSPS	PTSPTKEPGA	PQPTQAVLQE	DVDMSSGSSG	NENCSTGRDS
51	QGSDCDDNGK	ELRMLVESSN	THPSPDDAFR	LMMTEAEHNP	STSGCSSEQS
101	AKADAHKELI	RTLKELKVHL	PADKKAKGKA	STLATLKYAL	RSVKQVKANE
151	EYYQLLSMSE	SQPCSVDVPS	YSMEQVEGIT	SEYIVKNADM	FAVAVSLVSG
201	KILYISNQVA	SIFHCKKDAF	SDAKFVEFLA	PHDVSVFHSY	TTPYKLPPWS
251	VCSGLDSFTQ	ECMEEKSFFC	RVSVGKHEN	EIRYQPFMT	PYLVKVQEQQ
301	GAESQLCCLL	LAERVHSGYE	APRIPPEKRI	FTTHTPNCL	FQAVDERAVP
351	LLGYLPQDLI	ETPVLVQLHP	SDRPLMLAIH	KKILQAGGQP	FDYSPIRFRT
401	RNGEYITLDT	SWSSFINPWS	RKISFIIGRH	KVRVGPLNED	VFAASPCPEE
451	KTPHPSVQEL	TEQIHRLLMQ	PVPHSGSSGY	GSLGSNGSHE	HLMSQTSSSD
501	SNGQEESHRR	RSGIFKTSBK	IQTKSHVSHE	SGGQKEASVA	EMQSSPPAQV
551	KAVTTIERDS	SGASLPKASF	PEELAYKNQP	PCSYQQISCL	DSVIRYLESC
601	SEAATLKRKC	EFPANIPSRK	ATVSPGLHSG	EAARPSKVTS	HTEVSAHLSS
651	LTLPGKAESV	VSLTSQCSYS	STIVHVGDKK	PQPELETVED	MASGPESLDG
701	AAGGLSKEKG	PLQKLGLTKE	VLAHTQREE	QGFLQRFREV	SRLSALQAHK
751	QNYLQERSRA	QASDRGLRNT	SGLESSWKKT	GKNRKLSKR	VKTRDSSEST
801	GSGGPVSHRP	PLMGLNATAW	SPSDTSQSSC	PSAPFPTAVP	AYPLPVFQAP
851	GIVSTPGTVV	APPAATHTGF	TMPVVPMTQ	PEFAVQPLPF	AAPLAPVMAF
901	MLPSYPFPPA	TPNLPQAFLP	SQPHFPAHPT	LASEITPASQ	AEFPSRTSTL
951	RQPCACPVTP	PAGTVALGRA	SPPLFQSRGS	SPLQLNLLQL	EEAPEGSTGA
1001	AGTLGTTGTA	ASGLDCTSGT	SRDRQPKAPP	TCNEPSDTQN	SDAISTSSDL
1051	LNLLGEDLC	SATGSALSRS	GASATSDSLG	SSSLGFGTSQ	SGAGSSDTSH
1101	TSKYFGSIDS	SENNHKAKMI	PDTEESEQFI	KYVLQDPIWL	LMANTDDSIM
1151	MTYQLPSRDL	QAVLKEDQEK	LKLLQRSQPR	FTEGQRRELK	EVHPVWHTGG
1201	LPTAIDVTGC	VYCESEEKGN	ICLPYEEDSP	SPGLCDTSEA	KEEEGEQLTG
1251	PRIEAQTKGG	RADPAFLYKV	VDLEGPRFEG	KPIPNNLLGL	DSTRTGHHHH
1301	<u>HH</u>				

**Abbildung 6.4** – Sequenzabdeckung von murinem mPER2, Verdau mit Trypsin, Elastase, Thermolysin, Chymotrypsin, minimaler Mascot Score  $\geq 15$ ; **Rot**: Identifizierte Sequenzbereiche; **Schwarz**: Nicht identifizierte Sequenzbereiche, Einfach unterstrichen: V5-Tag; Doppelt unterstrichen: Histidin-Tag

## 6 Qualitative Analyse der Phosphorylierung und anderer PTM der mPER Proteine

1	MNGYVDFSPS	PTSPTKEPGA	PQPTQAVLQE	DVDMSSGSSG	NENCSTGRDS
51	QGSDCDDNGK	ELRMLVESSN	THPSPDDAFR	LMMTEAEHNP	STSGCSSEQS
101	AKADAHKELI	RTLKELKVHL	PADKKAKGKA	STLATLKYAL	RSVKQVKANE
151	EYYQLLSSE	SQPCSVDPVS	YSMEQVEGIT	SEYIVKNADM	FAVAVSLVSG
201	KILYISNQVA	SIFHCKKDAF	SDAKFVEFLA	PHDVSVFHSY	TTPYKLPPWS
251	VCSGLDSFTQ	ECMEEKSFFC	RVSVGKHHEN	EIRYQPFRT	PYLVKVQEQQ
301	GAESQLCCLL	LAERVHSGYE	APRIPPEKRI	FTTHTPNCL	FQAVDERAVP
351	LLGYLPQDLI	ETPVLVQLHP	SDRPLMLAIH	KKILQAGGQP	FDYSPIRFRT
401	RNGEYITLDT	SWSSFINPWS	RKISFIIGRH	KVRVGPLNED	VFAASPCPEE
451	KTPHPSVQEL	TEQIHRLLMQ	PVPHSGSSGY	GSLGNSGSHE	HLMSQTSSSD
501	SNGQEESHRR	RSGIFKTS GK	IQTKSHVSHE	SGGQKEASVA	EMQSSPPAQV
551	KAVTTIERDS	SGASLPKASF	PEELAYKNQP	PCSYQQISCL	DSVIRYLESC
601	SEAATLKRKC	EFPANIPSRK	ATVSPGLHSG	EAARPSKVT S	HTEVSAHLSS
651	LTLPGKAESV	VSLTSQCSYS	STIVHVGDKK	PQPELETVED	MASGPESLDG
701	AAGGLS QEKG	PLQKLGLTKE	VLAHTQREE	QGFLQRFREV	SRLSALQAHC
751	QNYLQERSRA	QASDRGLRNT	SGLESSWKKT	GKNRKLKSKR	VKTRDSSEST
801	GSGGPVSHRP	PLMGLNATAW	SPSDTSQSSC	PSAPFPTAVP	AYPLPVFQAP
851	GIVSTPGTVV	APPAATHTG F	TMPVVPMTQ	PEFAVQPLPF	AAPLAPVMAF
901	MLPSYPFPPA	TPNLPQAFLP	SQPHFPAHPT	LASEITPASQ	AEFPSRTSTL
951	RQPCACPVTP	PAGTVALGRA	SPPLFQSRGS	SPLQLNLLQL	EEAPEGSTGA
1001	AGTLGTTGTA	ASGLDCTSGT	SRDRQPKAPP	TCNEPSDTQN	SDAISTSSDL
1051	LNLLGEDLC	SATGSALSRS	GASATSDSLG	SSSLGFGTSQ	SGAGSSDTS H
1101	TSKYFGSIDS	SENNHKAKMI	PDTEESEQFI	KYVLQDPIWL	LMANTDDSIM
1151	MTYQLPSRDL	QAVLKEDQEK	LKLLQRSQPR	FTEGQRREL R	EVHPVWHTGG
1201	LPTAIDVTGC	VYCESEEKGN	ICLPYEEDSP	SPGLCDTSEA	KEEEGEQLTG
1251	PRIEAQTKGG	RADPAFLYKV	VDLEGPRFEG	KPIP NPLLGL	DSTRTGHHHH
1301	HH				

**Abbildung 6.5** – Identifizierte Phosphorylierungsstellen von murinem mPER2, minimaler Mascot Score  $\geq 15$ ; **Rot**: lokalisierte Phosphorylierungsstelle; **Blau**: nicht exakt lokalisierbare Phosphorylierungsstelle

### 6.3.3 Vergleich der Phosphorylierung von mPER1 und mPER2

Um die Lokalisierung der Phosphorylierungen von mPER1 und mPER2 besser vergleichen zu können, wurde mit Hilfe der Software ClustalX ein Sequence-Alignment von mPER1 und mPER2 vorgenommen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 6.6 und 6.7 dargestellt. Innerhalb der geschweiften Klammern sind die Peptide markiert, welche mehrfache Phosphorylierungen enthalten. Die Peptide von mPER1 sind dabei mit Großbuchstaben, die Peptide von mPER2 mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Mehrfach phosphorylierte Peptide, die Bereiche abdecken, die sowohl bei mPER1, als auch bei mPER2 phosphoryliert sind, sind mit Zahlen gekennzeichnet. Für diese wurden Extracted-Ion-Chromatogramme für die theoretischen Massen verschiedener Phosphorylierungszustände erstellt, um das Vorhandensein von Phosphoisomeren zu überprüfen. Eine Zuordnung der Peptide zu den Extracted-Ion-Chromatogrammen ist in Tabelle 6.2 auf Seite 73 zu finden. Die Extracted-Ion-Chromatogramme der zwischen mPER1 und mPER2 sequenzkonservierten Phosphorylierungsstellen sind auf den Seiten 77 bis 82 dargestellt, die weiteren Extracted-Ion-Chromatogramme finden sich im Anhang auf den Seiten 206 bis 221. Im Anhang ist ebenfalls ein Sequenz-Abgleich (*Sequence alignment*) mit Angabe der Ähnlichkeit der einzelnen Aminosäuren in den Abbildungen 1 und 2 auf den Seiten 204 und 205 abgebildet.

Cluster	Protein	Abbildung	
1	mPER1 & mPER2	6.8 & 6.9	(Seiten 77–78)
2	mPER1 & mPER2	6.10 & 6.11	(Seiten 79–80)
3	mPER1 & mPER2	6.12 & 6.13	(Seiten 81–82)
A	mPER1	3	(Seite 206)
B	mPER1	4	(Seite 207)
C	mPER1	5	(Seite 208)
D	mPER1	6	(Seite 209)
E	mPER1	7	(Seite 210)
a	mPER2	8	(Seite 211)
b	mPER2	9	(Seite 212)
c	mPER2	10	(Seite 213)
d	mPER2	11	(Seite 214)
e	mPER2	12	(Seite 215)
f	mPER2	13	(Seite 216)
g	mPER2	14	(Seite 217)
h	mPER2	15	(Seite 218)
i	mPER2	16	(Seite 219)
j	mPER2	17	(Seite 220)
k	mPER2	18	(Seite 221)

**Tabelle 6.2** – Verzeichnis der EICs der Phosphoisomere mehrfach phosphorylierter Peptide

## 6 Qualitative Analyse der Phosphorylierung und anderer PTM der mPER Proteine

				Cluster
mPER1	MSGPLEGADGGGDP RPGEFPCPGGVPSPGAPQHRPCPGPSLADDDANSNGSSGNESNGP	60		
mPER2	MNGYVDFS-----PSPTSPTKE-----PGAPQP---TQAVLQEDVDMSS-GSSGNEN---	43	a	
	<div> <div>1-3P,a</div> <div>1-4P,A</div> </div>			
mPER1	ESRGASQRSSSHSSSSGNGKDSALLETTESKSTNSQSPSPSSSIAYSLLSASSEQDNPS	120	A	
mPER2	--CSTGRDSQGSDDNGKELRMLVES-----SNTHPSPDADFRLMMTEAEH-NPS	91	b,c	
	<div> <div>1-3P,b</div> <div>1-3P,c</div> </div>			
mPER1	TSGCSSEQSARARTQKELMTALRELKRLPPERRGKGRSGTLATLQYALACVKQVQANQE	180		
mPER2	TSGCSESEQSAKADAHKELIRTLKELKVHLPADKKAKGKASTLATLKYALRSVKQVKANEE	151		
	<div> <div>1-3P,c</div> </div>			
mPER1	YYQQWSLEEGEPCAMDSTYTLEEEHITSEYTLRNQDTFSVAVSFLTGRIVYISEQAGV	240		
mPER2	YYQLMSSESQPCSDVPSYSMEQVEGITSEYIVKNADMFAVAVSLVSGKILYISNQVAS	211		
mPER1	LLRCKRDVFRGARFSELLAPQDVGVFYGSTTPSRLPTWGTGTSAGSGLKDFTEKSVFCR	300		
mPER2	IFHCKKDAFSDAKFVEFLAPHDVSFVHSYTTPTYKLPPWSVCSGLDSFTQECMEESFFCR	271		
mPER1	IRGGPDRDPGRYPYQPFRLTPYVTKIRVSDGAPAPCCLLIAERIHSGYEAPRIPDKRIF	360		
mPER2	VSVGKHHENEIRYQPFRTMYLVKQVEQQGAESQLCCLLLAERVHSGYEAPRIPPEKRIF	331		
mPER1	TTRHTPSCLFQDVERAAPLLGYLPQDLLGAPVLLFLHPEDRPLMLAIHKILQLAGQPF	420		
mPER2	TTHTPNCLFQAVDERAVPLLGYLPQDLIETPVVLVQLHPSDRPLMLAIHKILQAGGQPF	391		
mPER1	DHSPIRFCARNGEYVTMDTSWAGFVHPWSRKVAFVLGRHKVRTAPLNEDVFTPPAPSPAP	480		
mPER2	DYSPIRFRTRNGEYITLDTSWSSFINPWSRKISFIIGRHKVRVGPLNEDVFAASPCPEEK	451		
	<div> <div>1-5P,B</div> </div>			
mPER1	SLDSDIQELSEQIHRLLLQPVHSSSPTGLCGVGLMSPGPLHSPGSSSDSNGGDAEGPGP	540	B	
mPER2	TPHPSVQELTEQIHRLLMQPVPHSGSSGYSLGSGNSHEHLMSQTSSSDSNGQEESHRRR	511		
	<div> <div>B</div> </div>			
mPER1	PAPVTFQQICKDVHLVKHQGQQLFIESRAKPPPRPRLLATGTFKAKVLPCQSPNPELEVA	600		
mPER2	SGIFKTSGKIQTSHVSHESGGQKEASVAEMQSSP-----PAQVKAVTTIERDSSGA	563	d,e	
	<div> <div>1-4P,d</div> <div>1-3P,e</div> </div>			
	<div> <div>1-4P,C</div> </div>			
mPER1	PVPDQASLALAPEEPERKETSGCSYQQINCLDSILRYLESCNIPSTTKRKACSSSYTAS	660	C	
mPER2	SLPKAS----FPEELAYKNQPPCSYQQISCLDSVIRYLESCSEATLKRKCEFPANIPSR	619		
	<div> <div>1-3P,e</div> </div>			
	<div> <div>1-4P,C</div> </div>			
	<div> <div>1-5P,1</div> </div>			
mPER1	SASDDDKQRAGVPVPVGAKKDPSSAMLSGEGATPRKEP---VVGGLSPLALANKAESVVS	717	1	
mPER2	KAT-----VSPGLHSGEAAARPSKVTSHTEVSAHLSSLTLPGKAESVVS	662	f,1	
	<div> <div>1-2P,f</div> <div>1-5P,1</div> </div>			

Abbildung 6.6 – Multiphosphorylierte Peptide von mPER1 und mPER2 (Teil 1)

			Cluster
mPER1	VT <b>SQCSFS</b> STIVHVGDKKPESDIIMMEDLPGLAPGPAP <b>SPAP</b> SPTVAPDPTPDAYRPVG	777	D
mPER2	LT <b>SQCSYS</b> STIVHVGDKKPQPE----LETVEDMA <b>SGPES</b> LDGAAGGL <b>SQ</b> EKGP--LQKLG	716	g
mPER1	LTKAVLSLHTQKEEQAF <sup>1-5P,1</sup> LNRFRLGRLRGLDT-----SSVAPSAPGCHHG <sup>1-3P,g</sup> P-IPPG	827	
mPER2	LTKEVLAAHTQREEQGFLQRFREVSRLSALQAHCQNYLQERSRAQASDRGLRNT <b>SGLESS</b> <sup>1-2P,h</sup>	776	h
mPER1	RRHHCRSKAKRSRHHHHQTPRPETP--CYVSHSPSPVP--SSGPWPPPPAT-----TPFP	877	
mPER2	WKKTGKNRKLKSKRVKTRD <b>SSE</b> ST <b>SG</b> GGPVSHRPPLMGLNATAWSPSDTSQSSCPSAPFP	836	i
mPER1	AMVQPYPLPVFSPRG-----GPQPLPPAPTS-----VSPATFPSPLVT	915	
mPER2	TAVPAYPLPVFQAPGIVSTPGTVVAPPAATHGTFTMPVPMGTQPEFAVQPLPFAAPLA-	895	
mPER1	PMVALVLPNYLFP--TP-----PSYPYGVSQAPVEGPPTPASHSPSPS----LPPP--	960	
mPER2	PVMAFMLPSYPFPATPNLPQAF <sup>1-4P,2</sup> LPSQPHFPAHPTLASEITPASQAEFPSRTSTLRQPCA	955	
mPER1	-PLSPPH-----RPDSPLFNSRC <b>SS</b> PLQLNLLQLEES <b>S</b> PRTEGGAA--AGGPG <b>SS</b> AGPLP	1011	2
mPER2	CPV <b>T</b> PPAGTVALGRA <b>SP</b> PLFQ <b>SRG</b> <b>SS</b> PLQLNLLQLEEAPEGSTGAAGTLGTTGTAASGLD	1015	2
mPER1	PSEETA---EPEAR--LVEVTESSNQDAL <b>SGSS</b> DLELLLLQEDSRSGTGSAAAGSLGSGL	1066	E
mPER2	CTSGTSRDRQPKAPPTCNEPSDTQNSDAISTSSDLLNLLGEDLCSATGSALSRS <b>GASAT</b> <sup>1-4P,j</sup>	1075	j
mPER1	GSGSGSGSHEGGSTSASITRSSQSSHTSKYFG <b>SID</b> <b>SSE</b> -AEAGAARARTEPGDQVIKCVL	1125	3
mPER2	<b>S</b> DSLGSSSLGFG-TSQSGAGSSDTSHTSKYFG <b>SID</b> <b>SSE</b> NNHKAKMIPDTEESEQFIKYVL	1134	3
mPER1	QDPIWLLMANADQRVMMTYQVPSRDAASVLKQDRERLRAMQKQPRFSEDQRRELGAHVH	1185	
mPER2	QDPIWLLMANTDDSIMMTYQLPSRDLQAVLKEDQEKLKLLQRSQPRFTEGQRRELREVHP	1194	
mPER1	WVRKGQLPRALDVTACVDCGSSVQDPGH <b>SD</b> DLFSELDGLGLEPMEEGGEGGGCGVGGG	1245	
mPER2	WVHTGGLPTAIDVTGCVYCES-----EEKGNICLPYEED <b>SPSP</b> GLC-----	1235	k
mPER1	GGDGGEAAQTQIGAKGSSSQDSAMEEEQGGGSS <b>SP</b> ALPAEENSTSKGGRADPAFLYKV	1305	
mPER2	-----DTSEAKEEEGEQLTGPRIEAQ----TKGGRADPAFLYKV	1271	
mPER1	DLEGPRFEGKPIP <sup>1-2P,k</sup> NLLGLDSTRTGHHHHHH	1336	
mPER2	DLEGPRFEGKPIP <sup>1-2P,k</sup> NLLGLDSTRTGHHHHHH	1302	

Abbildung 6.7 – Multiphosphorylierte Peptide von mPER1 und mPER2 (Teil 2)

### 6.3.4 Phosphoisomere multiphosphorylierter Stellen von mPER1 und mPER2

#### Phosphorylierungskcluster 1

Der mit der Nummer 1 bezeichnete Phosphorylierungskcluster von mPER1 und mPER2 beinhaltet die sogenannte FASPS-Site. FASPS bezeichnet das „*Familial advanced sleep phase syndrome*“ eine autosomal dominante Krankheit, welcher eine Punktmutation von Serin 662 des humanen Proteins Period 2 zu Grunde liegt. Dabei ist das Serin 662 in der Casein-Kinase-I $\epsilon$ -Bindungsregion durch ein Glycin ersetzt, was *in vitro* zu einer Hypophosphorylierung von hPER2 führt (Toh et al., 2001). Symptom dieser Krankheit ist ein um vier Stunden nach vorne verschobener Schlaf-Wach-Zyklus. Daher ist die Phosphorylierung dieser Region von besonderem wissenschaftlichem Interesse.

Der Bereich um die FASPS-Site ist sowohl bei mPER1 (Abbildung 6.8 auf der nächsten Seite) als auch bei mPER2 (Abbildung 6.9 auf Seite 78) relativ stark phosphoryliert. Bei beiden Proteinen wurde das tryptische Peptid im zwei- bis fünffach phosphorylierten Zustand beobachtet. Das fünffach phosphorylierte Peptid weist trotz der verbesserten LC-Methodik aufgrund der starken Phosphorylierung eine sehr breite Peakform auf. Beim zweifach bis vierfach phosphorylierten Zustand des Peptids sind durch die HPLC aufgetrennte Phosphoisomere zu beobachten. Soweit möglich, wurden die Phosphorylierungsstellen der Isomere bestimmt. Dies ist in den entsprechenden Abbildungen eingetragen. Rot und blau markierte Aminosäuren stellen dabei lokalisierte bzw. nicht exakt lokalisierte Phosphorylierungsstellen dar. Es ist derzeit nicht geklärt, ob die Phosphoisomere eine biologische Bedeutung haben.

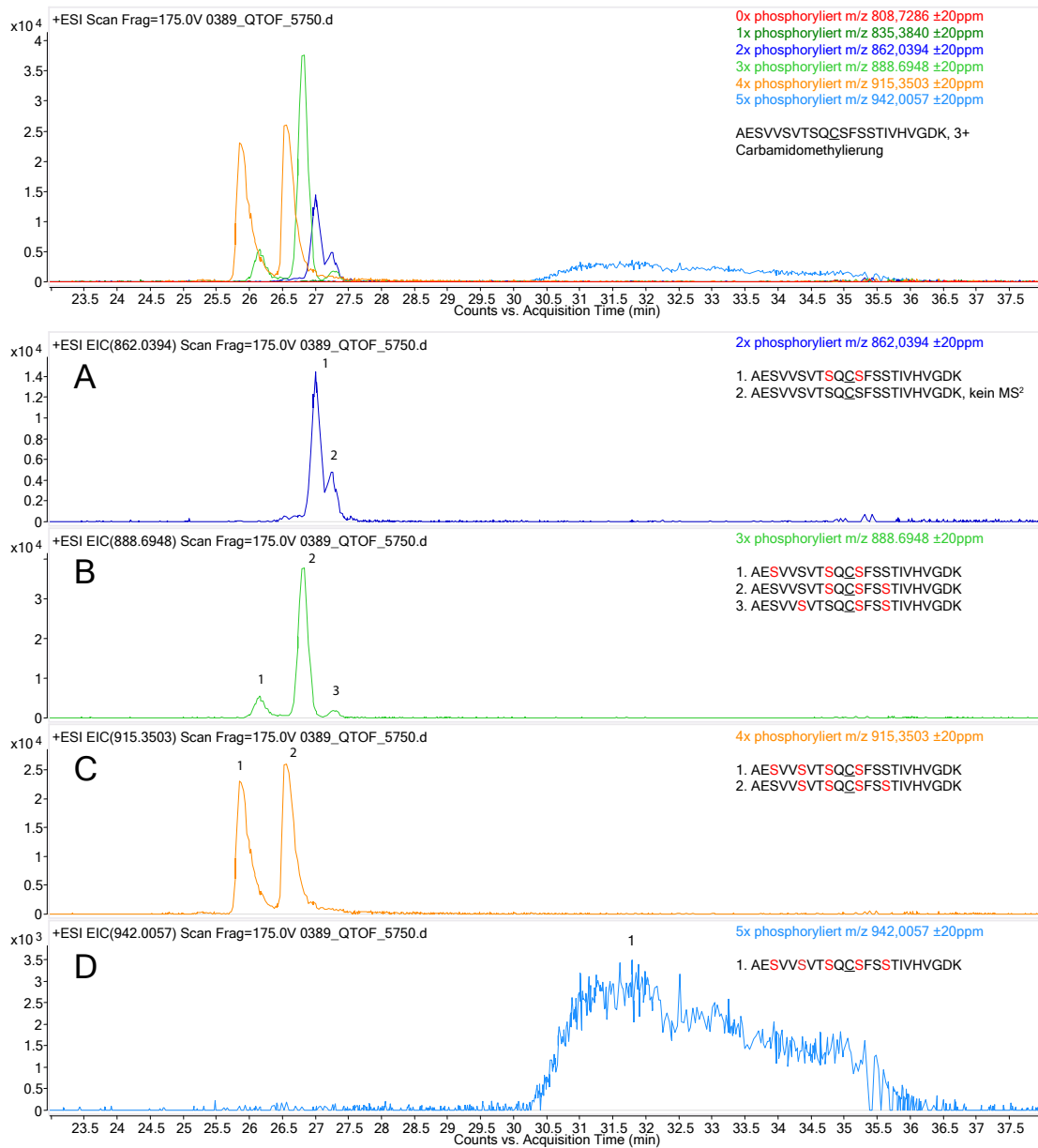
#### Phosphorylierungskcluster 2

Beim Phosphorylierungskcluster 2, welcher sowohl bei mPER1 als auch bei mPER2 auftrat, war dieser bei mPER1 im einfach und zweifach phosphorylierten Zustand identifizierbar. Bei mPER2 war das Peptid aufgrund einer anderen Proteasespaltstelle höher phosphoryliert (2- bis 4-fach). Für den gemeinsamen Sequenzabschnitt beider Peptide war eine zusätzliche Phosphorylierung bei mPER2 zu beobachten. Es ist nicht geklärt, ob diese Phosphorylierung bei mPER1 nicht auftritt, oder ob sich dies nur für die vorliegende Probe so darstellt. Durch die LC aufgetrennte Phosphoisomere waren bei diesem Phosphorylierungskcluster nicht zu beobachten.

#### Phosphorylierungskcluster 3

Beim dritten gemeinsamen Phosphorylierungskcluster waren die identifizierten Peptide für mPER1 und mPER2 jeweils im ein- bis dreifach phosphorylierten Zustand vorhanden. Für den einfach phosphorylierten Zustand sind ebenfalls wie bei den ersten beiden Phosphorylierungsklustern durch die LC aufgetrennte Phosphoisomere zu beobachten.

### Phosphorylierung des Clusters 1 (714–726) von mPER1

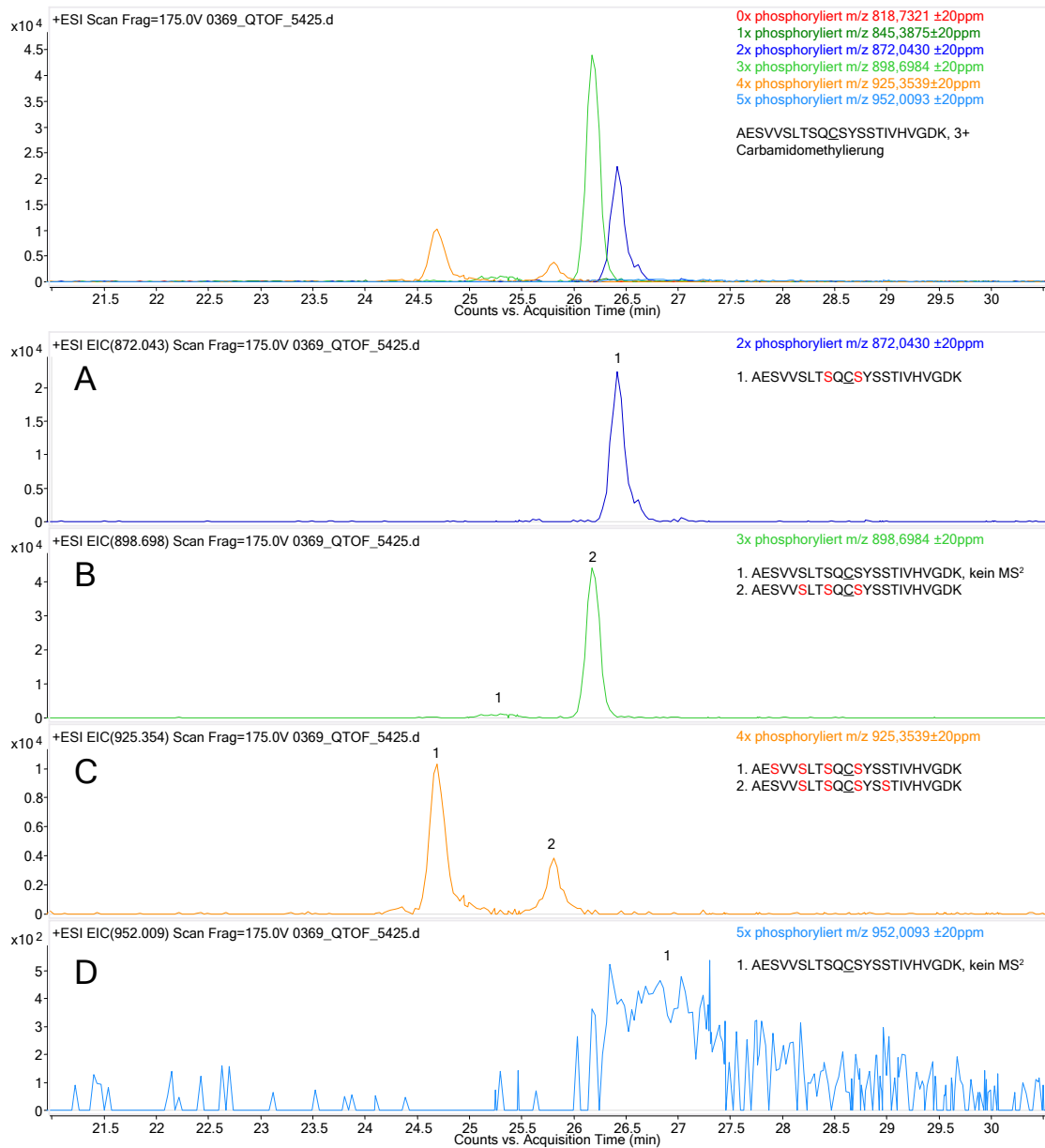


A | 2× phosphorylierte Peptide  
 B | 3× phosphorylierte Peptide

C | 4× phosphorylierte Peptide  
 D | 5× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 6.8** – Analyse der Phosphoisomere von AESVSVTSQCSFSSTIVHVGDK von mPER1 (1×Carbamidomethylierung); für die zwei- bis vierfach-phosphorylierten Peptidspezies sind chromatographisch getrennte Positionsisomere identifizierbar.

### Phosphorylierung des Clusters 1 (659–671) von mPER2



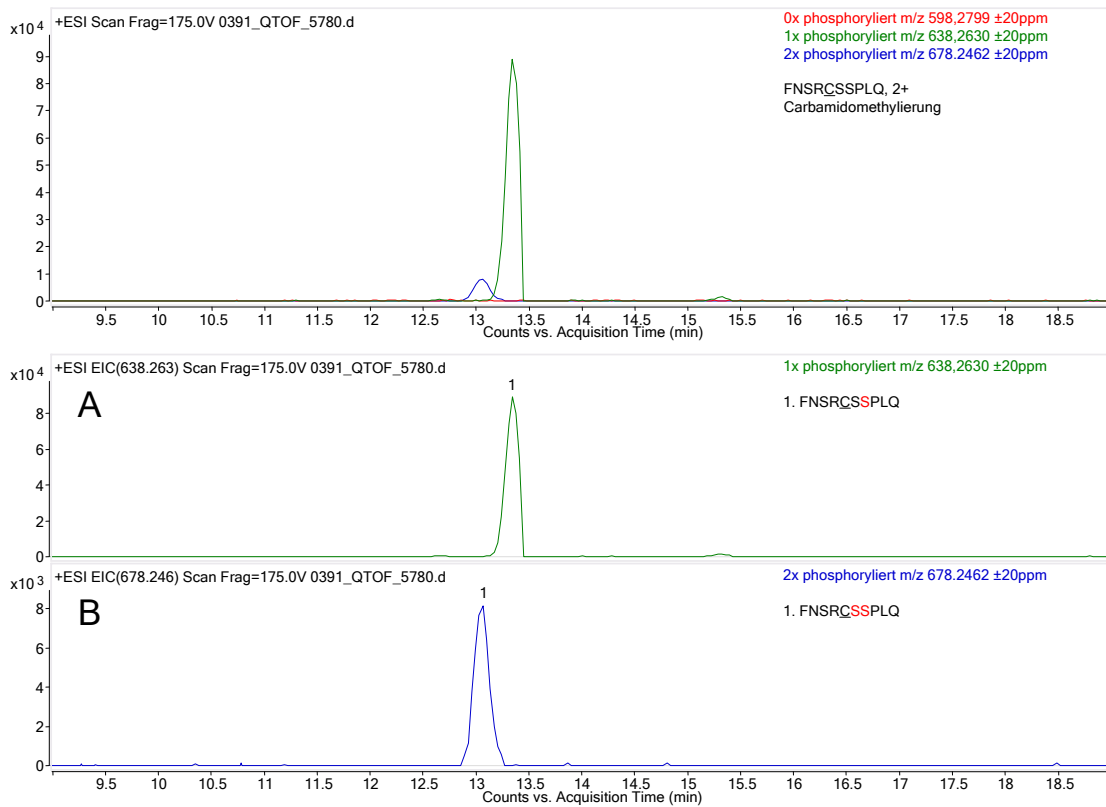
A | 2× phosphoryliertes Peptid  
B | 3× phosphorylierte Peptide

C | 4× phosphorylierte Peptide  
D | 5× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 6.9** – Analyse der Phosphoisomere von AESVSLTSQCSYSSTIVHVGDK von mPER2 (1×Carbamidomethylierung); für die drei- bis vierfach-phosphorylierten Peptidspezies sind chromatographisch getrennte Positionsisomere identifizierbar.



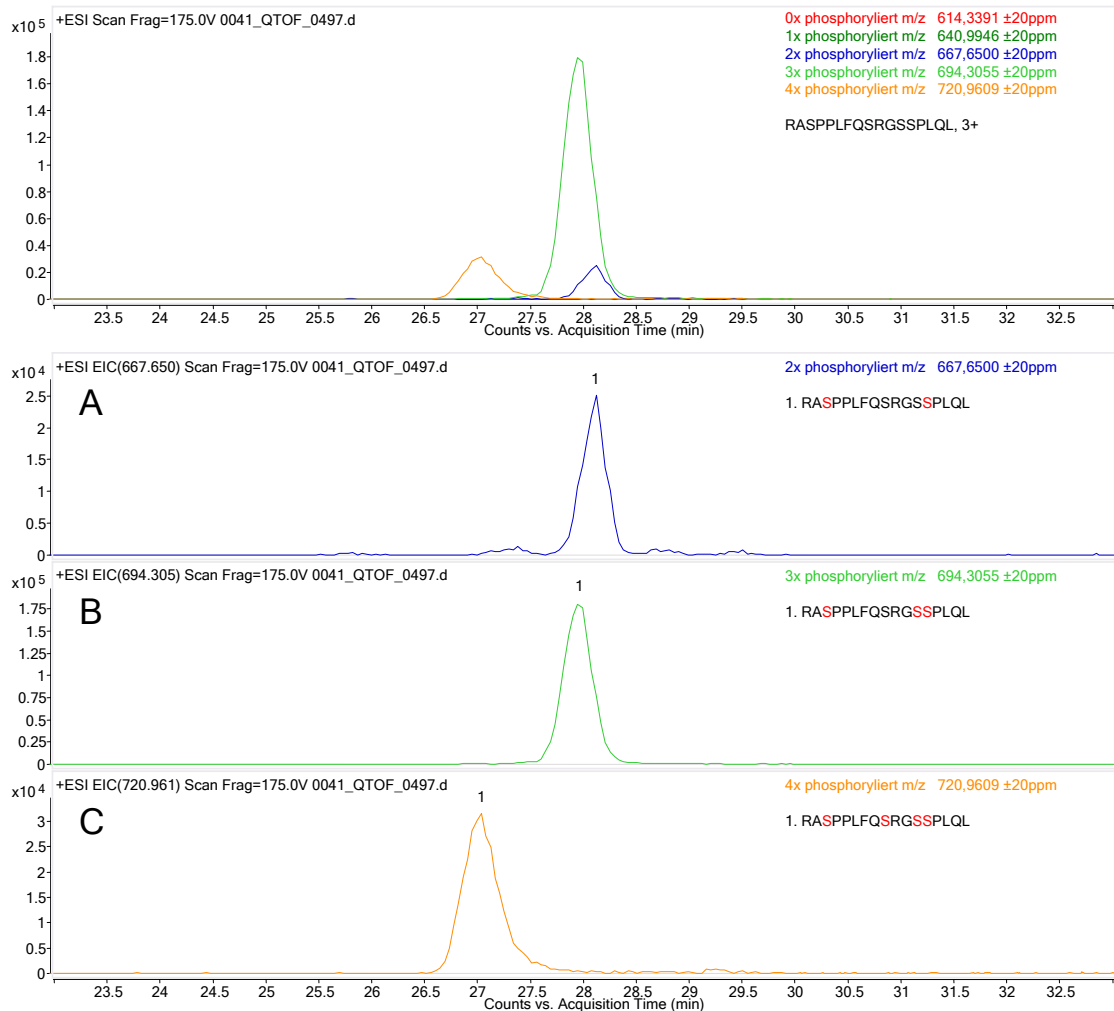
### Phosphorylierung des Clusters 2 (975–979) von mPER1



A | 1× phosphoryliertes Peptid  
B | 2× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 6.10** – Analyse der Phosphoisomere von FNSRCSSPLQ von mPER1 (1×Carbamidomethylierung); Es sind keine chromatographisch aufgetrennten Phosphoisomere identifizierbar.

### Phosphorylierung des Clusters 2 (971–981) von mPER2

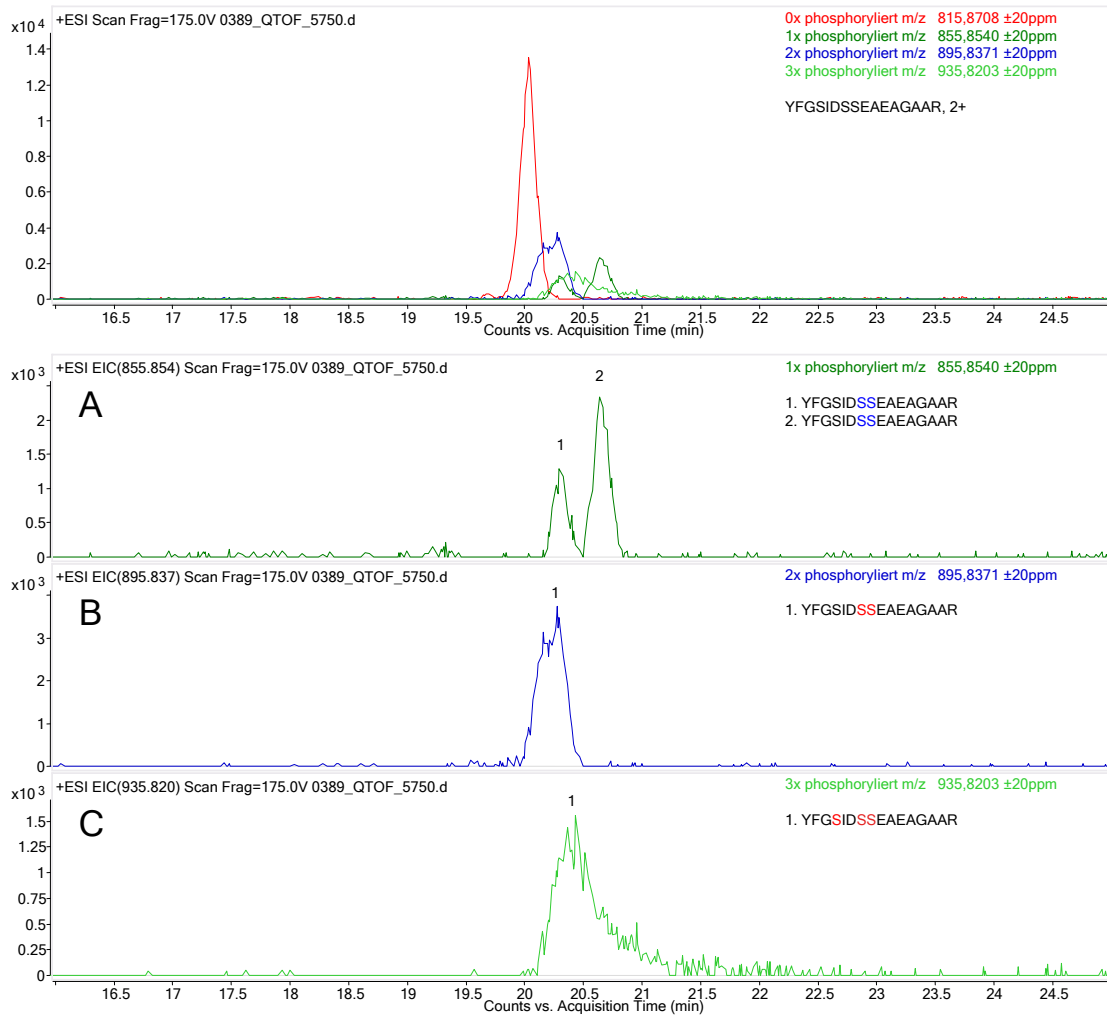


A | 2× phosphoryliertes Peptid  
 B | 3× phosphoryliertes Peptid

C | 4× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 6.11** – Analyse der Phosphoisomere von RASPPLEQSRGSSPLQL von mPER2; beim zweifach phosphorylierten Peptid sind möglicherweise Phosphoisomere vorhanden. Beim drei- und vierfach-phosphorylierten Peptid sind keine chromatographisch aufgetrennten Phosphoisomere identifizierbar.

### Phosphorylierung des Clusters 3 (1099–1103) von mPER1

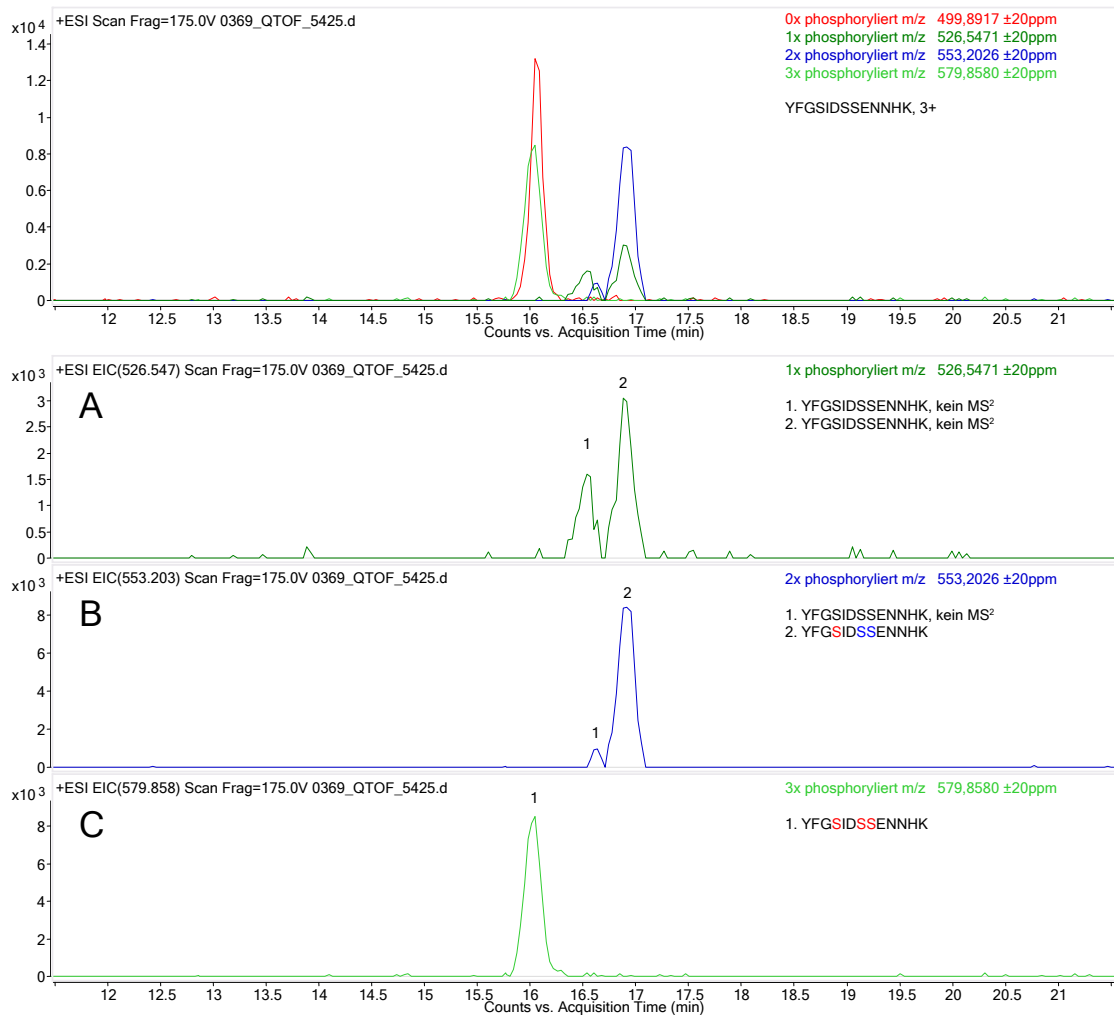


A | 1× phosphorylierte Peptide  
 B | 2× phosphoryliertes Peptid

C | 3× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 6.12** – Analyse der Phosphoisomere von YFGSID**S**SEAEAGAAR von mPER1; beim einfach phosphorylierten Peptid sind chromatographisch aufgetrennte Peptide zu erkennen, beim zweifach phosphorylierten Peptid könnte der breite Peak ebenfalls auf Isomere hindeuten, Beim dreifach phosphorylierten Peptid sind keine aufgetrennten Phosphoisomere zu identifizieren.

### Phosphorylierung des Clusters 3 (1107–1111) von mPER2



A | 1× phosphorylierte Peptide  
 B | 2× phosphorylierte Peptide

C | 3× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 6.13** – Analyse der Phosphoisomere von YFGSIDSSFNNHK von mPER2; beim ein- und zweifach phosphorylierten Peptid sind chromatographisch aufgetrennte Peptide zu erkennen. Beim dreifach phosphorylierten Peptid sind keine aufgetrennte Phosphoisomere identifizierbar.

### 6.3.5 Weitere mögliche gemeinsame Phosphorylierungscluster

Es gibt in der Sequenz von mPER1 und mPER2 weitere Abschnitte, die sequenzkonserviert sind, und welche bei einem der Peptide im hochphosphorylierten Zustand vorliegen. Dies ist bei den mit B und E bezeichneten Sequenzabschnitten von mPER1 (Abbildungen 6.6 und 6.7, Seiten 74 und 75) der Fall. Es war jedoch bei mPER2 in diesen Bereichen keine Phosphorylierung messbar. Nicht geklärt werden konnte, ob diese Stellen nur bei mPER1 phosphoryliert vorliegen, oder ob die Ursache im Phosphorylierungszustand der gemessenen Probe zu suchen ist.

### 6.3.6 Weitere posttranslationale Modifikationen

Neben der Phosphorylierung an Serin und Threonin treten an den mPER-Proteinen zusätzlich weitere posttranslationale Modifikationen auf. Neben einer Tyrosinphosphorylierung an mPER2 wurden eine N-terminale Acetylierung an mPER1 und mPER2, sowie eine Methylierung an mPER2 gefunden.

#### Tyrosinphosphorylierung an Y-576

Bei den Untersuchungen zur Phosphorylierung der Period-Proteine wurde an mPER2 eine Tyrosin-Phosphorylierung am Tyrosin 576 gefunden, welche in zwei Peptiden identifiziert wurde. Die MS<sup>2</sup>-Spektren der Peptide sind in Abbildung 6.14 auf Seite 84 dargestellt. In den Fragmentspektren ist auch das Immonium-Ion für Phosphotyrosin ( $m/z = 216,043$ ) zu erkennen, welches eine zusätzliche Bestätigung für die Tyrosinphosphorylierung darstellt (Steen et al., 2001), wobei das Signal im Spektrum relativ schwach ausfällt. Bei den Fragmentspektren der Peptide ApSLPKASFPEELApYK (A) und ASFPEELApYK (B) sind die intensiven y-Ionen der kollisionsinduzierten Spaltung N-terminal von Prolin zu erkennen. Im Fragmentspektrum des Peptids ASFPEELApYK finden sich außerdem interne a- und b-Ionen ( $a_{i4-5}$ ,  $b_{i4-5}$ ,  $b_{i4-6}$ ), welche durch eine weitere Fragmentierung des  $y_7$ -Ions entstehen.

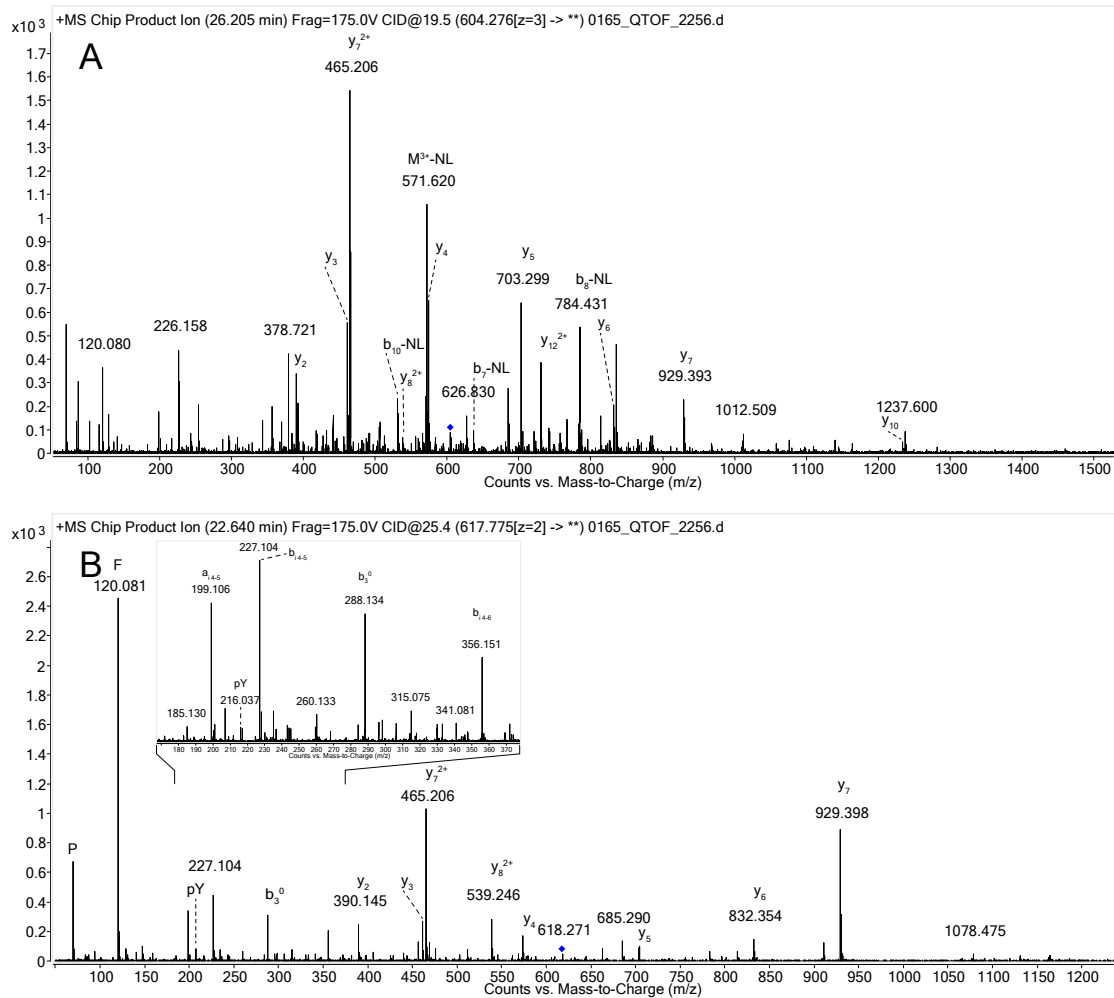
#### N-terminale Acetylierung bei mPER1 und mPER2

Sowohl bei mPER1 als auch bei mPER2 wurde eine N-terminale Acetylierung detektiert. Diese wurde ebenfalls in den Analysen beim Verdau mit verschiedenen Proteasen ermittelt. Die Peptide wiesen Mascot-Scores auf, die über der Homologieschwelle (*Homology threshold*) bei der Datenbanksuche lagen.

#### Methylierung an Lysin 607 bzw. Arginin 608 bei mPER2

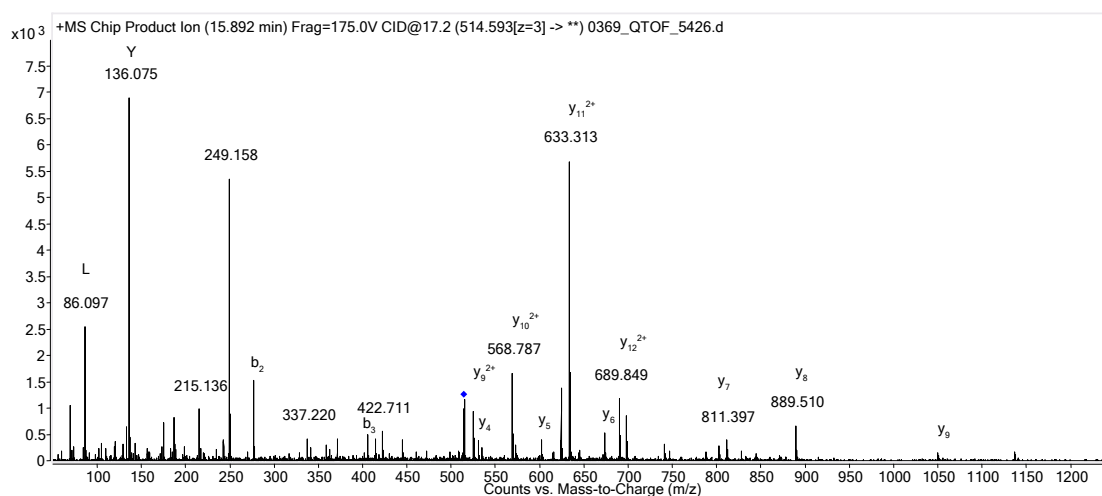
Bei den Messungen von mPER2 wurde durch die Suche mit Mascot Server eine mögliche Methylierungsstelle im tryptischen Peptid YLESCSEAATLKR ermittelt. Das Peptid wies einen hohen Mascot-Score von 68 auf und wurde sowohl bei der Direktmessung als auch in der Waschfraktion der Phosphopeptidanreicherung mit TiO<sub>2</sub> identifiziert. Wie in Abbildung 6.15 auf Seite 85 zu sehen ist, weist das Peptid eine gute y-Ionen Serie auf.

## 6 Qualitative Analyse der Phosphorylierung und anderer PTM der mPER Proteine



A	Fragmentspektrum des Peptides ApSLPKASFPEELApYK
B	Fragmentspektrum des Peptides ASFPEELApYK

**Abbildung 6.14** – Fragmentspektren der Peptide ApSLPKASFPEELApYK (A) und ASFPEELApYK (B), welche auf die Phosphorylierung des Tyrosins Y-576 hindeuten; Beide Spektren weisen die intensiven y-Ionen der kollisionsinduzierten Spaltung N-terminal von Prolin auf. Der Neutralverlust im Spektrum A ist auf die dortige Serinphosphorylierung zurückzuführen und tritt bei  $y_3$  nicht auf. Bei Spektrum B ist außerdem das typische Immonium-Ion des Phosphotyrosins ( $m/z = 216,043$ ) zu finden. Zusätzlich sind durch die starke Fragmentierung an  $y_7$  interne a- und b-Ionen ( $a_{i4-5}$ ,  $b_{i4-5}$ ,  $b_{i4-6}$ ) im Spektrum zu finden, welche durch die erneute Fragmentierung des  $y_7$ -Ions entstehen.



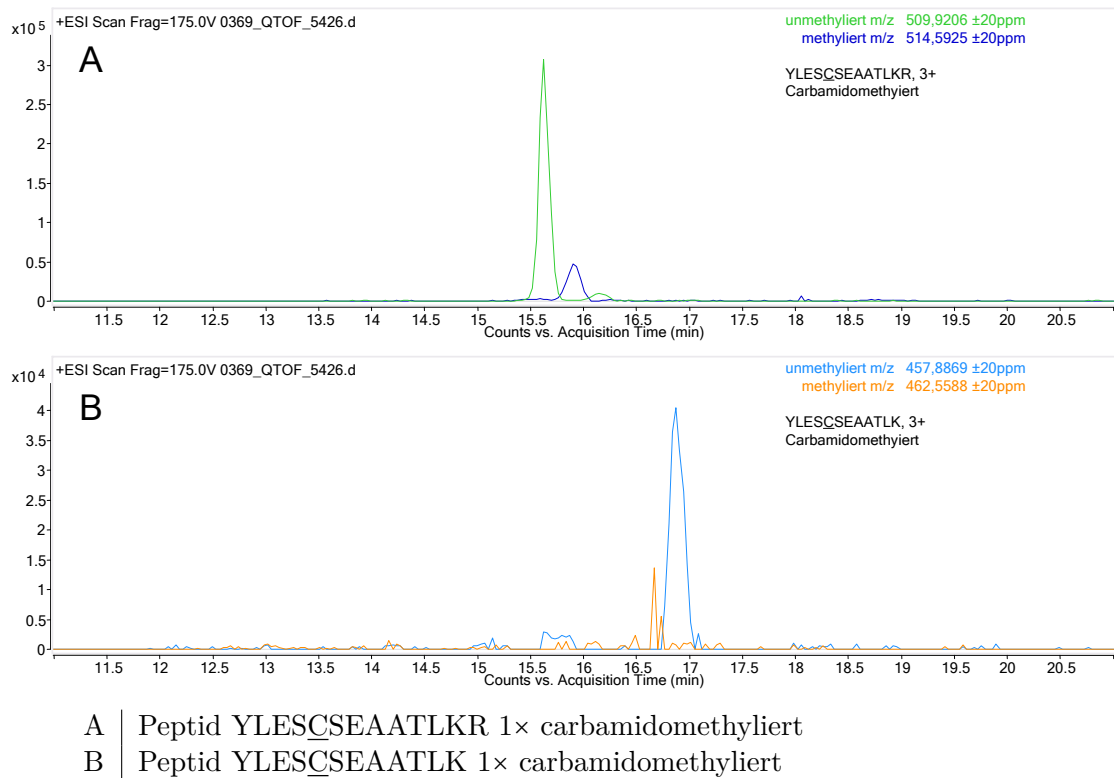
**Abbildung 6.15** – Fragmentspektrum des methylierten Peptids YLESCSEAATLKR (1× Carbamidomethylierung); da im Fragmentspektrum das  $y_1$ - bzw. das  $b_{12}$ -Ion nicht vorhanden sind, kann aus dem Fragmentspektrum die Methylierungsstelle nicht exakt bestimmt werden, sondern nur auf K-607 oder R-608 eingeschränkt werden.

Allerdings liegen die  $y$ -Ionen im Bereich der möglichen Methylierungsstellen am Arginin ( $y_1$ -Ion) und Lysin ( $y_2$ -Ion) im Bereich des Rauschens, was eine direkte Lokalisierung der Stelle verhindert.

Es wurde im Folgenden versucht, die Methylierungsstelle mit Hilfe unterschiedlicher Peptide zu lokalisieren. Dafür wurden von den Peptiden YLESCSEAATLKR (1× carbamidomethyliert) und YLESCSEAATLK (1× carbamidomethyliert) Extracted-Ion-Chromatogramme in der jeweils unmethylierten und methylierten Variante erstellt, siehe Abbildung 6.16 (Seite 86).

In den Extracted-Ion-Chromatogrammen des Peptids YLESCSEAATLKR (A) ist sowohl die methylierte, als auch die nichtmethylierte Variante des Peptids zu identifizieren. In den Extracted-Ion-Chromatogrammen des Peptids YLESCSEAATLK (B) hingegen ist nur die nichtmethylierte Variante erkennbar. Dies lässt vermuten, dass sich die Methylierung am Arginin 608 befindet. Es ist jedoch möglich, dass sich die Methylierung am Lysin 607 befindet und durch ihre Anwesenheit die proteolytische Spaltung C-terminal des Lysins verhindert. Dies hätte ebenfalls zur Folge, dass man nur das Peptid YLESCSEAATLKR vorfindet und keine methylierte Spezies des Peptids YLESCSEAATLK findet. Somit war es nicht möglich, die Methylierung auf eine Aminosäure exakt zu lokalisieren. Die Position der Methylierung kann jedoch auf die Aminosäuren Lysin 607 und Arginin 608 eingeschränkt werden.

## 6 Qualitative Analyse der Phosphorylierung und anderer PTM der mPER Proteine



**Abbildung 6.16** – Ansatz zur Lokalisierung der Methylierung durch den Vergleich von verschiedenen Peptiden; während beim Peptid YLESCSEAATLKR die methylierte Form im EIC gefunden wird fehlt diese beim Peptid YLESCSEAATLK. Dies würde auf eine Methylierung am Arginin hindeuten; falls die Methylierung sich am Lysin befände und die Proteolyse behindern würde, wäre diese Annahme allerdings falsch.

### 6.4 Diskussion

Durch die verbesserte Methodik der Phosphopeptidanreicherung mittels  $\text{TiO}_2$  sowie der LC-MS-Analyse gelang es, mehr Phosphorylierungsstellen als bisher bekannt an den Period-Proteinen zu identifizieren. Jedoch stellt die Analyse von multiphosphorylierten Peptiden und insbesondere ihrer Phosphoisomere noch eine Herausforderung dar. So weisen bislang multiphosphorylierte Peptide sowohl unter CID- als auch unter ETD-Bedingungen mit den verwendeten Massenspektrometern schlechte Fragmentspektren auf, durch welche sich die Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen schwierig gestaltet. Hier könnte durch den Einsatz von hochauflösenden ETD-Massenspektrometern eine bessere Analytik erreicht werden.

In Bezug für die Funktionsweise der circadianen Uhr ist die Phosphorylierung vermutlich für mehrere Regulationsschritte von Bedeutung. So konnten Phosphorylierungsstellen an mPER2 identifiziert werden, welche in Sequenzbereichen des Proteins liegen, die



1	MNGYVDF	<u>SPS</u>	<u>PTSPTKEPGA</u>	PQPTQAVLQE	DVDMSSGSSG	NENCSTGRDS
51	QGSDCDDNGK	ELRMLVESSN	<u>THPS</u> PDDAFR	LMMTEAEHNP	<u>STSGCS</u> SEQS	
101	AKADAHKELI	<u>RTLKELKVHL</u>	PADKKAKGKA	STLATLKYAL	RSVKQVKANE	
151	EYYQLMSSE	<u>SQPCSVDVPS</u>	<u>YSMEQVEGIT</u>	<u>SEYIVKNADM</u>	<u>FAVAVSLVSG</u>	
201	<u>KILYISNQVA</u>	<u>SIFHCKKDAF</u>	<u>SDAKFVEFLA</u>	<u>PHDVSVFHSY</u>	<u>TPYKLP</u> PWS	
251	VCSGLDSFTQ	ECMEESFFC	RVSVGKHEN	EIRYQPFRT	PYLKVQEQQ	
301	GAESQLCCLL	LAERVHSGYE	APRIPPEKRI	<u>FTTHTPNCL</u>	<u>FQAVDERAVP</u>	
351	<u>LLGYLPQDLI</u>	<u>ETPVLVQLHP</u>	<u>SDRPLMLAIH</u>	<u>KKILQAGGQP</u>	<u>FDYSP</u> IRFRT	
401	<u>RNGEYITLDT</u>	<u>SWSSFINPWS</u>	<u>RKISFI</u> GRH	<u>KVRVG</u> PLNED	VFAASPCPEE	
451	KTPHPSVQEL	<u>TEQIHRLLMQ</u>	<u>PVPHSGSSGY</u>	<u>GSLG</u> NGSHE	HLMSQTSSSD	
501	SNGQEESHRR	<u>RSGIFK</u> TS GK	IQTKSHV	<u>SHE</u>	<u>SGGQKEASVA</u>	EMQSSPPAQV
551	KAVTTIERDS	<u>SGASLPKASF</u>	<u>PEELAY</u> KNQP	<u>PCSYQQISCL</u>	<u>DSVIRYLESC</u>	
601	<u>SEAATLK</u> <u>RKC</u>	<u>EFPANIPSRK</u>	<u>ATVSPGLHSG</u>	<u>EAARPSK</u> VT S	<u>HTEVSAHLSS</u>	
651	<u>LTLPGKAESV</u>	<u>VSLTSQCSYS</u>	<u>STIVHVGDKK</u>	<u>PQPELETVED</u>	<u>MASGPESLDG</u>	
701	<u>AAGGLSQEKG</u>	<u>PLQKLGLTKE</u>	<u>VLAHTQREE</u>	<u>QGFLQR</u> FREV	<u>SRLSALQAHC</u>	
751	<u>QNYLQERSRA</u>	<u>QASDRGLRNT</u>	<u>SGLES</u> <u>SWKKT</u>	<u>GKNRKLKSKR</u>	<u>VKTRD</u> <u>SSEST</u>	
801	<u>GSGGPVSHRP</u>	PLMGLNATAW	SPSDTSQSSC	PSAPFPTAVP	AYQLPVFQAP	
851	GIVSTPGTVV	APPAATHTGF	TMPVVPMGTQ	PEFAVQPLPF	AAPLAPVMAF	
901	MLPSYPFPPA	TPNLPQAFLP	SQPHFPAHPT	LASEITPASQ	AEFPSRTSTL	
951	RQPCACPV	<u>TP</u>	<u>PAGTVALGRA</u>	<u>SPPLFQSRGS</u>	<u>SPLQLNLLQL</u>	EEAPEGSTGA
1001	AGTLGTTGTA	ASGLDCTSGT	SRDRQPKAPP	TCNEPSDTQN	SDAISTSSDL	
1051	LNLLGEDLC	SATGSALSRS	<u>GASAT</u> <u>SDSLG</u>	SSSLGFGTSQ	SGAGSSDTS	
1101	TSKYFG	<u>SIDS</u>	<u>SENNHKAKMI</u>	PDTEESEQFI	KYVLQDPIWL	LMANTDDSIM
1151	MTYQLPSRDL	<u>QAVLKEDQEK</u>	<u>LKLLQRSQPR</u>	<u>FTEGQRREL</u> R	<u>EVHPWVHTGG</u>	
1201	<u>LPTAIDVTGC</u>	<u>VYCESEEKGN</u>	<u>ICLPYEEDSP</u>	<u>SPGLCDTSEA</u>	<u>KEEEGEQLTG</u>	
1251	<u>PRIEAQTKGG</u>	<u>RADPAFLYKV</u>	<u>VDLEGPRFEG</u>	<u>KPIP</u> NLLGL	<u>DSTR</u> TGHHHH	
1301	HH					

**Abbildung 6.17** – Identifizierte Phosphorylierungsstellen und Methylierung (farbig markierte Buchstaben) von murinem mPER2 im Kontext bekannter Interaktionsmotive (farbig unterstrichene Bereiche); **Rot**: lokalisierte Phosphorylierungsstelle; **Blau**: nicht exakt lokalisierte Phosphorylierungsstelle; **Pink**: nicht exakt lokalisierte Methylierungsstelle

bekannte Bindungsdomänen darstellen, siehe Abbildung 6.17 auf Seite 87. So wurden insbesondere im Bereich der CKI $\epsilon$ - und mCRY-Bindungsdomäne, sowie im Bereich eines  $\beta$ -TRCP1-Interaktionsmotives, Phosphorylierungsstellen gefunden. Außerdem finden sich in der Proteinsequenz in der Umgebung des NLS-Motivs sowie zweier NES-Motive Phosphorylierungsstellen. Es lassen sich jedoch unter anderem aufgrund der unbekannten 3D-Struktur des Proteins keine Rückschlüsse auf eine Funktionalität der Phosphorylierungsstellen ziehen. So könnten bei einem gefalteten Protein auch Phosphorylierungsstellen, welche nicht sequenznah an den Domänen und Motiven liegen, einen Einfluss auf diese haben. Für die funktionelle Beschreibung der Phosphorylierungsstellen sind daher weitere quantitative Experimente notwendig, in welchen der Einfluss verschiedener Kinasen und Phosphatasen auf den Phosphorylierungsstatus der Proteine beobachtet wird. Ein erstes dieser Experimente mit überexprimierter *Serine/threonine-protein phosphatase 2A* in Kombination mit  $^{15}\text{N}$ -Labeling ist in Kapitel 9 ab Seite 125 gezeigt.

## 7 Labelfreie Bestimmung des Phosphorylierungsgrades

### 7.1 Einleitung

Die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades bietet gegenüber der relativen Quantifizierung der Phosphorylierung Vorteile. So kann man bei erstgenannter direkt den Prozentsatz an Phosphorylierung einer bestimmten Aminosäure auf dem Protein bestimmen, bei letzterer nur den Faktor der Veränderung der Phosphorylierung. Die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades kann sowohl mittels labelfreier Methoden (Steen et al., 2005) als auch mit Hilfe von Isotopenlabeling, zum Beispiel mit SILAC (Olsen et al., 2010), und durch den Einsatz von minimal permutierten (Winter et al., 2010) oder isotopengelabelten Peptiden (Zinn et al., 2009, 2010) erfolgen. Außerdem ist die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades bei cystein- und methioninhaltigen Peptiden durch die simultane Messung von  $^{31}\text{P}$ -Phosphor und  $^{32}\text{S}$ -Schwefel mittels ICP-MS möglich (Wind et al., 2001b).

Es lag nahe, den Ansatz von Steen et al. (2005) zur labelfreien Bestimmung des Phosphorylierungsgrades auf den Multiproteaseverdau zu erweitern. Durch die Analyse verschiedener Peptide für eine Phosphorylierungsstelle würde man so validere Werte für den Phosphorylierungsgrad erhalten. Da ein Peptid und sein korrespondierendes Phosphopeptid unterschiedliche Ionisierungseffizienzen besitzen, ist eine einfache Bestimmung des Verhältnisses von nichtphosphoryliertem und phosphoryliertem Peptid anhand der Signalintensitäten im Massenspektrum nicht möglich. Zudem kann die Phosphorylierung auch eine Verschiebung des Ladungszustandes zwischen dem phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptidion im Massenspektrometer bewirken. Da die Unterschiede in der Ionisierung von Peptid zu Peptid verschieden sind, müssen sie für jedes Peptid individuell bestimmt werden.

Daher wurden für die labelfreie Methode zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades zuerst Vorversuche durchgeführt um Korrekturfaktoren für die einzelnen Peptide zu ermitteln, siehe Pfad A in Abbildung 7.1 auf Seite 91. Der Korrekturfaktor ist umso genauer zu ermitteln, wenn sich die Signalverhältnisse von phosphoryliertem zu nichtphosphoryliertem Peptid stark unterscheiden. Da bei dem Ansatz keine Phosphopeptid-Standards zum Einsatz kamen, wurden daher die Phosphopeptide mittels  $\text{TiO}_2$ -Material angereichert. So erhält man hauptsächlich phosphorylierte Peptide. Diese Probe wurde im Anschluss an die Anreicherung geteilt und eine Hälfte dephosphoryliert. Die beiden Hälften wurden anschließend nacheinander gemessen. Da die Gesamtmenge an phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Peptid in den beiden Proben gleich ist, kann man aus den Signalverhältnissen der Messung des phosphorylierten Peptids und derer des

dephosphorylierten Peptids den Korrekturfaktor für die Signale berechnen.

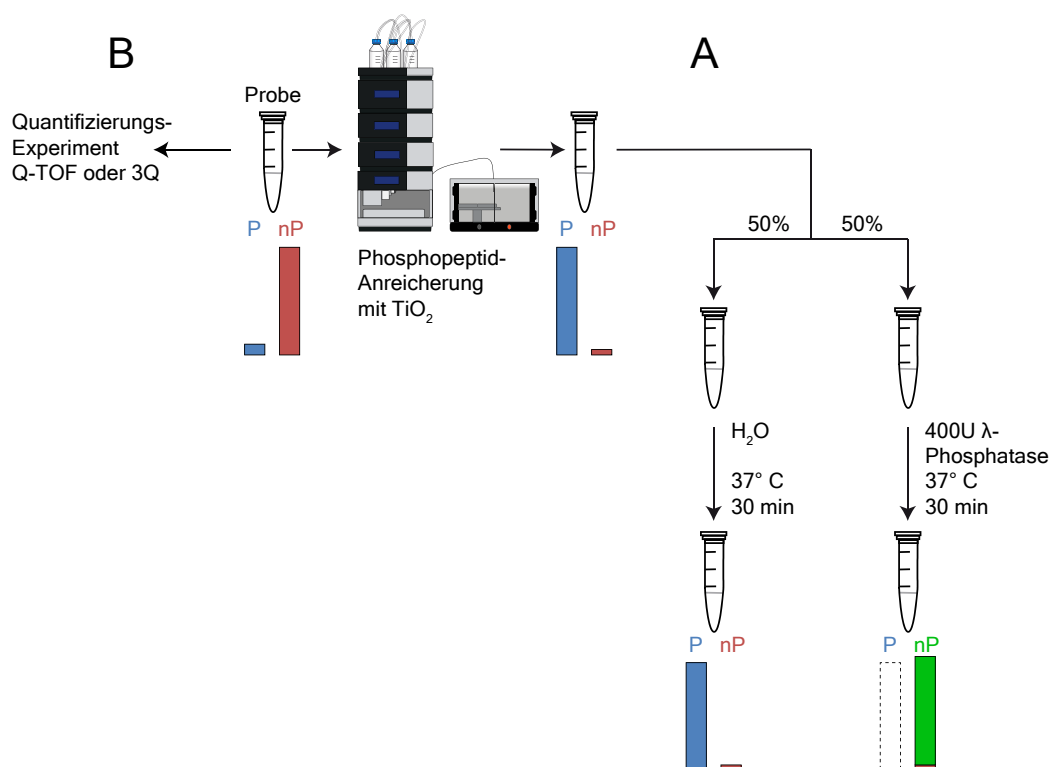
Im Anschluss an diese Vorversuche erfolgte dann die eigentliche Messung, siehe Pfad B in Abbildung 7.1 auf Seite 91. Aus dieser kann man dann mit Hilfe des vorher ermittelten Korrekturfaktors den Phosphorylierungsgrad berechnen.

## 7.2 Material und Methoden

Als Testprotein für die Messungen wurde *cAMP-Dependent protein kinase catalytic subunit alpha* (PKA) (Biaffin GmbH & Co KG, Kassel, Germany) verwendet. Dieses Protein weist mehrere bekannte Autophosphorylierungsstellen auf, welche nahezu vollständig phosphoryliert sind. Die Messungen der Vorversuche wurden zuerst an einem 3Q-Massenspektrometer durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass die hohe Massenpräzision des Q-TOFs und die Möglichkeit, weitere erfasste Peptide zur Ermittlung eines Korrekturfaktors zu quantifizieren sich als wichtiger herausstellten, als die hohe Selektivität und Sensitivität des 3Q-Massenspektrometers. Daher wurden alle Versuche am Q-TOF gemessen.

Für die Vorversuche zur Bestimmung der Signalverhältnisse von phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptiden wurden 20 pmol PKA mit den Proteasen Trypsin, Elastase und Thermolysin im Gel verdaut. Anschließend wurden die Phosphopeptide über  $\text{TiO}_2$  angereichert. Der Ablauf der Anreicherung entsprach dabei weitestgehend den in Tabelle 3.1 auf Seite 39 beschriebenen Schritten. Es wurde jedoch im dritten Schritt statt mit 100 mM Zitronensäure pH 9,5 mit 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer, der auf pH 9,5 eingestellt war, eluiert. Die Elution erfolgte mit Ammoniumhydrogencarbonat, da die Aktivität der  $\text{Mn}^{2+}$  abhängigen  $\lambda$ -Phosphatase durch Zitronensäure inhibiert wird. Dies geschieht vermutlich durch die Komplexbildung der  $\text{Mn}^{2+}$ -Ionen durch die Zitronensäure. Den 20  $\mu\text{l}$  an Eluat wurden 1  $\mu\text{l}$  10 $\times$   $\lambda$ -Phosphatase-Puffer (500 mM HEPES, pH 7,5, 50 mM Dithiothreitol, 1 mM EGTA und 0,1 % BRIJ35) und 2  $\mu\text{l}$  10 $\times$   $\text{MnCl}_2$ -Lösung (20 mM) hinzugegeben und mittels Vortexmischer gemischt. Die Probe wurde im Verhältnis 1:1 entsprechend jeweils 10  $\mu\text{l}$  aufgeteilt. Der einen Hälfte wurde 1  $\mu\text{l}$  Wasser und der anderen Hälfte 1  $\mu\text{l}$  (400 U)  $\lambda$ -Phosphatase (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) (Zhuo et al., 1993) hinzugegeben. Dann wurde für 30 Minuten bei 37 °C dephosphoryliert. Anschließend wurde beiden Ansätzen 1,2  $\mu\text{l}$  1 M Zitronensäure hinzugegeben und die Dephosphorylierungsreaktion somit gestoppt. Beide Hälften wurden nacheinander am Q-TOF gemessen, siehe Pfad A in Abbildung 7.1 auf Seite 91. Dieses Experiment wurde für jede Protease fünfmal durchgeführt und aus den ermittelten Peakintensitäten die Korrekturfaktoren bestimmt.

Zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades wurde die Probe nach dem Protease-verdau, abnehmen des Überstandes und der Extraktion aus dem Gel mit 5 % FA ohne weitere Zwischenschritte gemessen, siehe Pfad B in Abbildung 7.1 auf Seite 91.

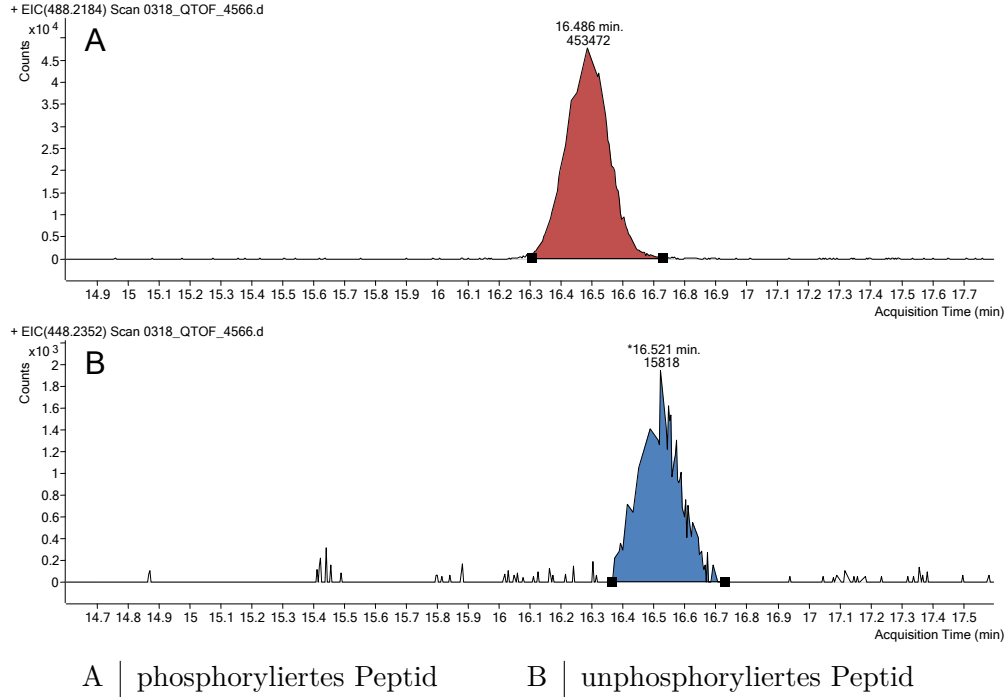


**Abbildung 7.1** – Arbeitsablauf für die labelfreie Bestimmung des Phosphorylierungsgrades; Pfad A: Vorversuche zur Bestimmung des Signalverhältnisses zwischen Phosphopeptid und korrespondierendem nichtphosphorylierten Peptid, Pfad B: Messung der Probe bei der eigentlichen Quantifizierung.

## 7.3 Ergebnisse

Für die Dephosphorylierung wurden verschiedene Methoden getestet. Es wurde chemisch mit 70 % Flusssäure in Pyridin und enzymatisch mit boviner alkalischer Phosphatase (Roche Diganostics GmbH, Mannheim, Deutschland) oder  $\lambda$ -Phosphatase (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) dephosphoryliert. Die Wahl fiel letzten Endes auf die  $\lambda$ -Phosphatase, da diese eine höhere Dephosphorylierungsaktivität als die alkalische Phosphatase besitzt und in der Handhabung ungefährlicher als Flusssäure ist. Für die Vorversuche wurden fünf PKA-Proben pro Protease entsprechend dem Arbeitsablauf nach Pfad A in Abbildung 7.1 behandelt und am Q-TOF gemessen. Anschließend wurden die Daten mit der Software *Masshunter quantitative analysis for Q-TOF* ausgewertet und die Peakflächen des Phosphopeptids und des dephosphorylierten Peptids sowohl für die phosphorylierte Spezies (siehe Abbildung 7.2 auf Seite 92) als auch für die dephosphorylierte Spezies (siehe Abbildung 7.3 auf Seite 93) berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.1 auf Seite 94 beispielhaft für eine Phosphorylierungsstelle und Protease aufgeführt.

## 7 Labelfreie Bestimmung des Phosphorylierungsgrades



**Abbildung 7.2** – Extracted-Ion-Chromatogramme von TLGTpSFGR, 2+ (A) und TLGT-SFGR, 2+ (B) nach Phosphopeptidanreicherung mit  $\text{TiO}_2$

Wie in Abschnitt 7.1 beschrieben, besitzen das phosphorylierte ( $P$ ) und das nicht-phosphorylierte ( $nP$ ) Peptid unterschiedliche Ionisierungseffizienzen ( $a$ ) und ( $b$ ). Die gemessenen Signalintensitäten  $I$  entsprechen somit unterschiedlichen Mengen an Peptid. Die Gesamtmenge an phosphorylierten und nichtphosphorylierten Peptid in den beiden Fraktionen ist jedoch konstant, siehe Gleichung (7.1). Daher kann man nach der Dephosphorylierung der einen Fraktion für die Signalintensitäten das in Gleichung (7.2) dargestellte Verhältnis herstellen. Die Signalintensitäten der Messung der phosphorylierten Fraktion ( $H_2O$ ) sind hierbei mit  $I_{H_2O}$ , die der dephosphorylierten Fraktion ( $\lambda$ ) mit  $I_\lambda$  bezeichnet.

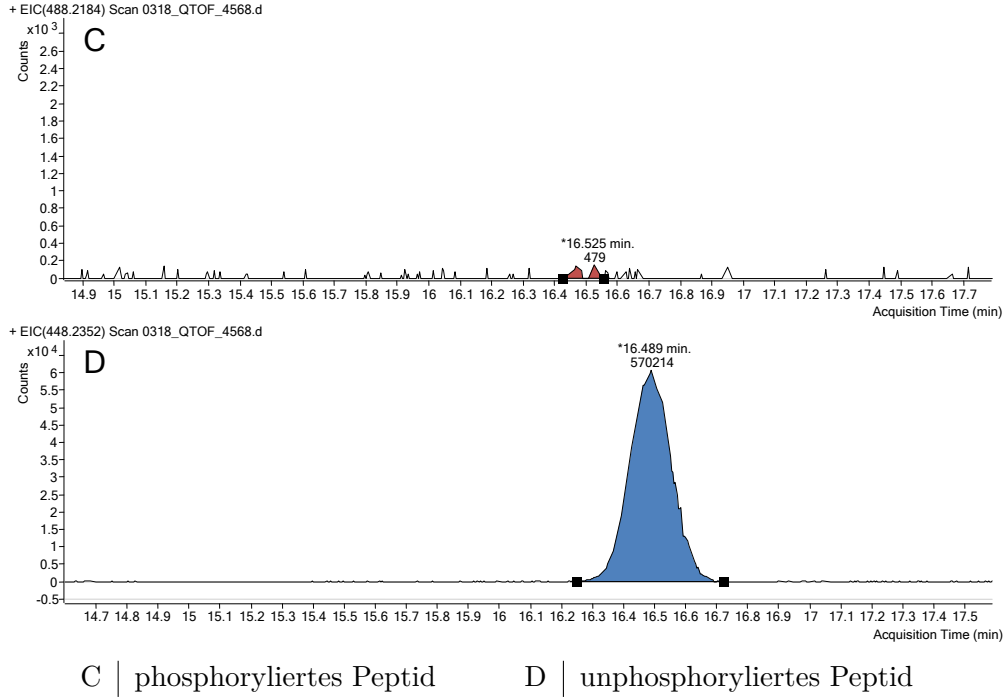
$$aI(nP) + bI(P) = \text{konstant} \quad (7.1)$$

$$aI_\lambda(nP) + bI_\lambda(P) = aI_{H_2O}(nP) + bI_{H_2O}(P) \quad (7.2)$$

Umformen ergibt das Verhältnis der Ionisierungseffizienzen  $\frac{a}{b}$ , siehe Gleichung (7.3).

$$\frac{a}{b} = \frac{I_\lambda(nP) - I_{H_2O}(nP)}{I_{H_2O}(P) - I_\lambda(P)} \quad (7.3)$$

Um eventuellen Schwankungen bei der Probenvorbereitung Rechnung zu tragen, wird in



**Abbildung 7.3** – Extracted-Ion-Chromatogramme von TLGTpSFGR, 2+ (C) und TLGT-SFGR, 2+ (D) nach Phosphopeptidanreicherung mit TiO<sub>2</sub> und Dephosphorylierung mit  $\lambda$ -Phosphatase

Gleichung (7.4) der Korrekturfaktor  $k$  eingesetzt, welcher das quantitative Verhältnis der nichtphosphorylierten Peptide in den Messungen ( $H_2O$ ) und ( $\lambda$ ) darstellt. Dieses wurde in den Versuchen mit Hilfe der Mascot Distiller *Quantitation Toolbox* ausgerechnet.

$$\frac{a}{b} = \frac{I_{\lambda}(nP) - k \times I_{H_2O}(nP)}{k \times I_{H_2O}(P) - I_{\lambda}(P)} \quad (7.4)$$

Wie in Tabelle 7.1 auf Seite 94 dargestellt ist, ergibt eine Wiederholung der Experimente einen gut reproduzierbaren Quotienten  $\frac{a}{b}$  für die Ionisierungseffizienzen von Phosphopeptid und nichtphosphoryliertem Peptid. Bei den anderen Phosphorylierungsstellen stellte sich dies ähnlich dar. Aus dem Mittelwert der Verhältnisse der Ionisierungseffizienzen  $\frac{a}{b}$ , siehe Gleichung (7.4), wurde der Korrekturfaktor  $x$  für das Hauptexperiment errechnet, siehe Gleichung (7.5). Nach dem Beispiel aus Tabelle 7.1 auf Seite 94 ergibt sich für das arithmetische Mittel von  $\frac{a}{b}$ :

$$\frac{a}{b} = 1,1623 \quad (7.5)$$

## 7 Labelfreie Bestimmung des Phosphorylierungsgrades

Versuch	H <sub>2</sub> O		$\lambda$ -Phosphatase		Korrekturfaktor	Verhältnis der Ionisierung
	P <i>I</i>	nP <i>I</i>	P <i>I</i>	nP <i>I</i>		
0318_QTOF_4566_68	453472	15818	479	570214	1,03	1,1907
0318_QTOF_4570_72	402117	9488	650	452724	0,96	1,1502
0328_QTOF_4760_62	366937	5024	0	423742	0,93	1,2280
0328_QTOF_4764_66	344775	7259	45	390394	0,98	1,1345
0330_QTOF_4801_03	341247	7322	69	392973	1,02	1,1078
Mittelwert (Standardabweichung)						1,1623 ( $\pm 0,05$ )

**Tabelle 7.1** – Ergebnisse der Messungen zur Bestimmung des Verhältnisses der Ionisierungseffizienzen  $\frac{a}{b}$  für das Peptidpaar TLGTGpSFGR/TLGTGSFGR, 2+ (S-53), Verdau mit Trypsin

Der Kehrwert von Gleichung (7.5) ergibt den Korrekturfaktor  $x$  für Gleichung (7.7):

$$x = \frac{a}{b} = 0,8604 \quad (7.6)$$

Zur eigentlichen Bestimmung des Phosphorylierungsgrades des Proteins wurde Pfad B des Arbeitsablaufes durchgeführt, siehe Abbildung 7.1 auf Seite 91. Dabei wurden wiederum die Extracted-Ion-Chromatogramme für die unphosphorylierte und die phosphorylierte Spezies aufgenommen, siehe Abbildung 7.4 auf Seite 96. Einsetzen der mit der Software *MassHunter Quantitative Analysis for Q-TOF* ermittelten Werte für die integrierten Peakflächen und des Korrekturfaktors  $x$  in Gleichung (7.6) ergab den Phosphorylierungsgrad des Peptids an der gemessenen Phosphorylierungsstelle, siehe Gleichung (7.7).

Bestimmung des Phosphorylierungsgrades  $\frac{P}{nP+P}$ :

$$\text{Phosphorylierungsgrad (\%)} = \frac{b \times I(P)}{x \times b \times I(nP) + b \times I(P)} \times 100\% \quad (7.7)$$

Einsetzen der Werte aus dem Hauptexperiment ergibt:

$$\text{Phosphorylierungsgrad (\%)} = \frac{49156}{0,862 \times 5952752 + 49156} \times 100\% = 0,95\% \quad (7.8)$$

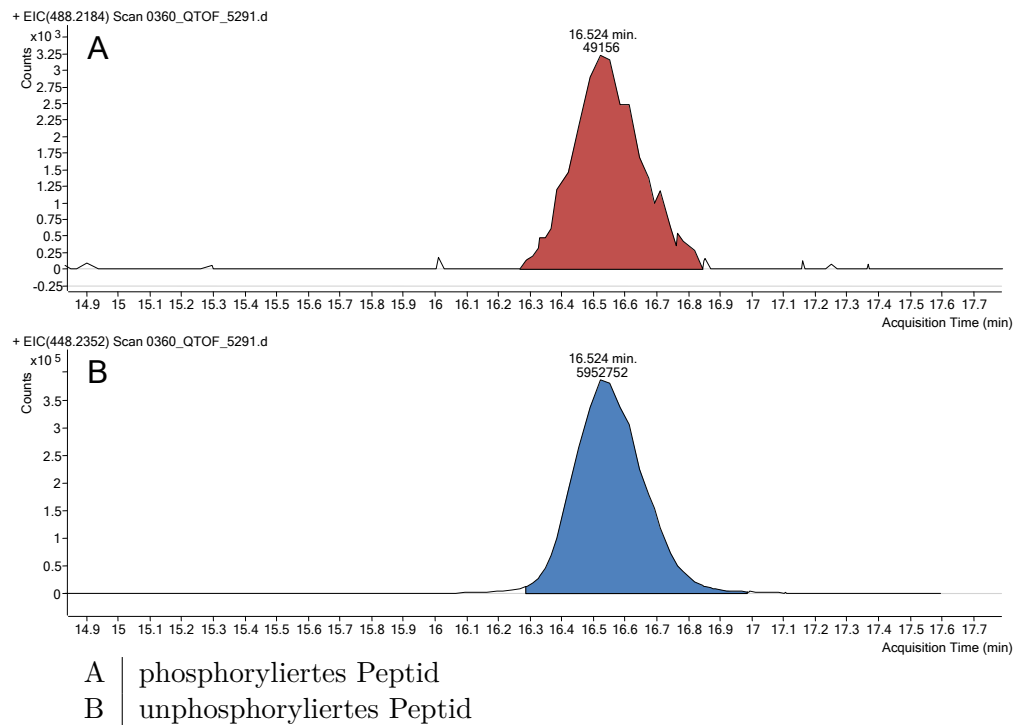
Die direkte Messung wurde für jede Protease einmal durchgeführt. Der Phosphorylierungsgrad wurde jeweils für alle analysierten Stellen bestimmt, siehe Tabelle 7.2 auf Seite 95.



Phosphorylierungsstelle	Enzym	$I$ phosphoryliert	$I$ dephosphoryliert	Korrekturfaktor $x$	Phosphorylierungsgrad $\frac{n_{P+P}}{P}$ in %	Peptid	Ladung	Modifikationen
S-10	Trypsin	376290	230528	1,818	47,31	KGSEQESVKEFLAK	3+	
	Elastase	309646	191367	1,134	58,80	KKGSEQESVKEFLA	3+	
	Thermolysin	12731	9765	1,959	39,96	GNAAAAKKSEQESVKEF	3+	
		37340	47719	6,215	11,18	AAAKKSEQESVKEF	3+	
S-53	Thermolysin	150108	154452	33,360	2,83	AAKKSEQESVKEF	3+	
		49156	5952752	0,862	0,95	TLGTGSFGR	2+	
	Elastase	2517	86364	0,715	3,92	LGTGSFGRVMLV	2+	1
		11490	656690	0,725	2,36	GTGSFGRVMLV	2+	1
S-139	Thermolysin	12574	14748	0,819	51,01	LGTGSFGRVM	3+	
		34532	56145	0,883	41,05	LGTGSFGRVM	2+	1
	Trypsin	34532	356185	0,804	10,76	LGTGSFGR	2+	
		172887	0	1,114	100,00	RIGRFSEPHAR	3+	
S-197	Elastase	632041	3322	3,704	98,09	IGRFSEPHAR	3+	
		65017	3322	0,156	99,21	IGRFSEPHAR	4+	
	Thermolysin	38664	27711	1,898	42,37	GRFSEPHARFYAA	3+	
		15361	12424	1,690	42,25	GRFSEPHARFYA	3+	
T-197	Thermolysin	545110	75523	3,804	65,49	IGRFSEPHARF	3+	
		387917	64570	4,090	59,49	IGRFSEPHAR	3+	
	Trypsin	948	2460	0,570	40,35	TWLCGTPEYLAPEIILSK	2+	
		263461	949	0,907	99,67	VKGRTWLCGTPEY	3+	2
S-338	Elastase	14953	6286	1,197	66,53	RVSINEKCGKEFTEF	3+	2
		4381	1045	1,048	80,00	RVSINEKCGKEFT	3+	2

**Tabelle 7.2** – Ermittelter Phosphorylierungsgrad verschiedener Phosphorylierungsstellen (**rot** markiert) von PKA nach Verdau mit verschiedenen Proteasen, Modifikationen: 1 Methionin-Oxidation, 2 Carbamidomethylierung

## 7 Labelfreie Bestimmung des Phosphorylierungsgrades



**Abbildung 7.4** – Extracted-Ion-Chromatogramme von TLGTPSFGR, 2+ (A) und TLGTPSFGR, 2+ (B); direkte Messung im Hauptexperiment ohne vorherige Phosphopeptidanreicherung mittels TiO<sub>2</sub>

## 7.4 Diskussion

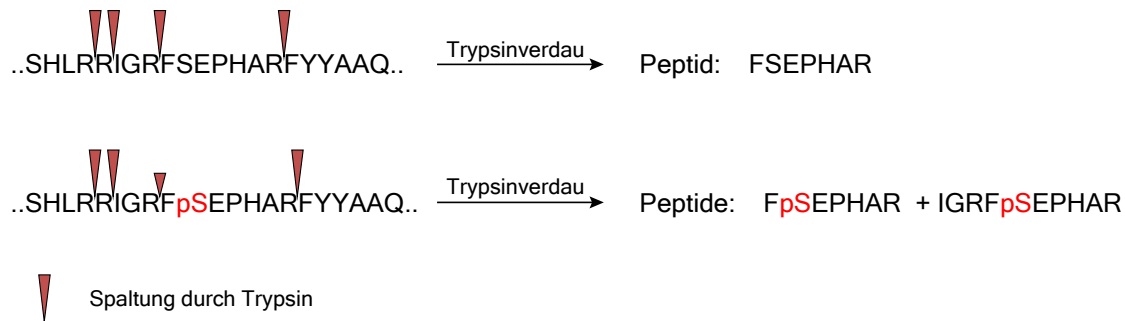
Die mit der verwendeten Methode ermittelten Phosphorylierungsgrade weichen zum Teil erheblich von den zu erwarteten Werten von ca. 95–100 % für den Phosphorylierungsgrad an den autophosphorylierten Stellen des Proteins ab. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Seidler et al. (2009), welche ebenfalls den Phosphorylierungsgrad der PKA mit einer anderen Methode ermittelten. Zudem konnten bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten weniger Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Die Ursache dafür könnte die verwendete PKA sein.

Aus Tabelle 7.2 auf Seite 95 ist ersichtlich, dass die ermittelten Phosphorylierungsgrade der einzelnen Phosphorylierungsstellen zum Teil erheblich schwanken. Wie man beispielsweise an der Phosphorylierungsstelle S-139 sehen kann, weicht der dort ermittelte Phosphorylierungsgrad von 99–100 % beim Verdau mit Trypsin erheblich vom ermittelten Phosphorylierungsgrad von ca. 42 % beim Verdau mit Elastase ab.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt in der Beeinflussung der enzymatischen Proteinspaltung durch die Phosphorylierung (Thiede et al., 2000; Schlosser et al., 2001; Steen et al., 2005). Bei der PKA werden die Phosphorylierungsstellen S-10, S-139, T-197 und S-338 durch die Konsensus-Sequenzen RXP[S/T], R[R/K]XP[S/T]

und KRXXp[S/T] (X=beliebige Aminosäure) autophosphoryliert (Gnad et al., 2007). Dies führt beim proteolytischen Verdau dieser Stellen mit Trypsin mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Peptiden, bei welchen die Phosphorylierung die Protease beeinflusst. Die enzymatische Spaltung des Proteins nach Lysin und Arginin beim proteolytischen Verdau mit Trypsin wird dabei beeinträchtigt, wenn eine phosphorylierte Aminosäure im Bereich von  $\pm 3$  Aminosäuren um die Spaltstelle der Protease vorliegt. Dieser Vorgang ist in Abbildung 7.5 auf Seite 97 dargestellt. Es wird vermutet, dass andere Proteasen durch die Phosphorylierung ebenfalls in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden.

Dies führt bei der verwendeten lautfreien Bestimmung des Phosphorylierungsgrades vermutlich zu den schwankenden Ergebnissen für die unterschiedlichen Peptide einer Phosphorylierungsstelle. Im Fall des Peptidpaars aus phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Peptid, welches durch die reguläre Spaltung entsteht, führt dies zu einem falsch niedrigen Verhältnis von Phosphopeptid zu Peptid. Bei der Betrachtung des Peptids, welches durch die Fehlsplaltung entsteht, wird fälschlicherweise ein erhöhtes Verhältnis von Phosphopeptid(Fehlsplaltung) zu Peptid(Fehlsplaltung) gemessen. Da man bei der verwendeten Methode den Korrekturfaktor für die Signalintensitäten von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Peptid vergleicht, führt eine Beeinträchtigung der Proteinsplaltung zu einem falsch ermittelten Korrekturfaktor. Da Elastase eine sehr geringe Spezifität bei der proteolytischen Spaltung aufweist, ist anzunehmen, dass beim Verdau mit Elastase eher Peptide entstehen, welche von dieser Problematik betroffen sind. Bei den in Tabelle 7.2 auf Seite 95 ermittelten Werten des Phosphorylierungsgrades ist zu erkennen, dass eher die Werte der Peptide, deren proteolytische Spaltstelle weiter von der Phosphorylierung entfernt ist, mit denen aus der Literatur übereinstimmen.



**Abbildung 7.5** – Behinderung der Proteaseaktivität durch die Phosphorylierung; im Beispiel sind die Peptide dargestellt, die durch den tryptischen Verdau entstehen, wenn das Serin an der Position S-139 von PKA unphosphoryliert (oben) und phosphoryliert (unten) vorliegt. Es entstehen je nach Phosphorylierung der Aminosäure unterschiedliche Peptide, was die lautfreie Quantifizierung verfälschen kann.

## 7 Labelfreie Bestimmung des Phosphorylierungsgrades

Beim verwendeten Ansatz konnte der Phosphorylierungsgrad einer Phosphorylierungsstelle aufgrund des oben beschriebenen Problems nicht durch das Messen verschiedener Peptide validiert werden. Die Methode eignet sich somit in der verwendeten Form nicht für die zuverlässige Bestimmung des Phosphorylierungsgrades. Durch die Autophosphorylierung des Proteins PKA trat die Beeinflussung des proteolytischen Verdaus gehäuft auf, weshalb das Protein als Testprotein für diese Methode hohe Ansprüche stellte. Es könnte jedoch versucht werden, das Problem der unvollständigen Spaltung durch die Proteasen durch veränderte Bedingungen des Verdaus zu verringern. Dafür wären jedoch weitere Versuche mit unterschiedlicher Dauer des Verdaus und eingesetzter Menge an Protease notwendig.

Für die Verwendung der labelfreien Bestimmung des Phosphorylierungsgrades bei mehrfachphosphorylierten Peptiden sind bei der verwendeten Methode für ein zweifach phosphoryliertes Peptid drei Phosphorylierungsstufen notwendig, um die Korrekturfaktoren für die Signalintensitäten zu berechnen. Da bei den Period-Proteinen viele noch höher phosphorylierte Peptide auftreten, wäre die Methode entsprechend sehr aufwendig und das Risiko einer Beeinflussung der proteolytischen Spaltung durch die Phosphorylierung relativ hoch.

In Kapitel 8 ab Seite 99 wurde daher versucht, eine Methode zu entwickeln, welche diese Problematik umgeht.

## 8 Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen durch chemisches Labeling

### 8.1 Einleitung

Die bei den Versuchen zur labelfreien Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades auftretenden Probleme lassen sich vermutlich hauptsächlich auf die Beeinflussung der Protease in ihrer proteolytischen Aktivität in der Nähe phosphorylierter Aminosäuren zurückführen. Daneben stellt bei hochphosphorylierten Peptiden auch der Verlust dieser Peptide durch die Adsorption an Metallatome in der HPLC ein Problem dar. Wie schon in Abschnitt 6.1.2 auf Seite 64 gezeigt wurde, zeigen hochphosphorylierte Peptide ein schlechtes Fragmentierungsverhalten bei CID und ETD.

Ziel war es daher, eine Methode zu schaffen, mit der man die oben genannten Probleme umgehen kann, indem man durch chemische Modifikation die „problematische“ Phosphatgruppe durch eine Gruppe ersetzt, die günstigere Eigenschaften für LC-MS aufweist. Der theoretische Verlauf des Labelings setzt sich dabei aus drei Schritten der chemischen Modifikation zusammen:

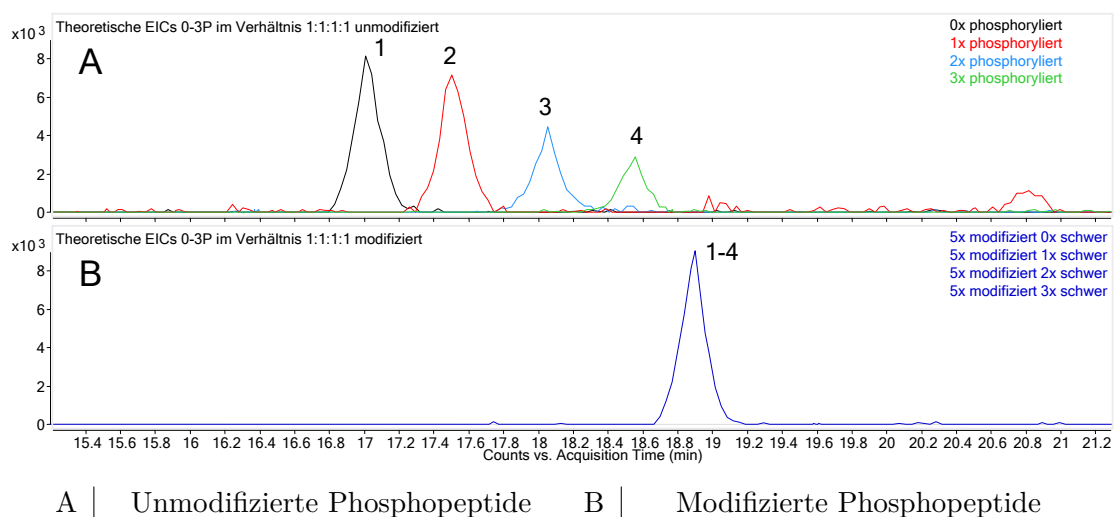
1. Veresterung der freien Serin- und Threoningruppen
2. Dephosphorylierung der phosphorylierten Serin- und Threoningruppen
3. Veresterung der neuen freien Serin- und Threoningruppen mit Isotopenmarkierung

Das Konzept der Isotopenmarkierung ist am Beispiel eines nichtphosphorylierten und eines phosphorylierten Serins in Abbildung 8.3 auf Seite 102 dargestellt. Die Veresterung kann z.B. mit Acetanhydrid oder Propionsäureanhydrid erfolgen. Die Abbildung 8.1 auf Seite 100 zeigt, wie sich ein mehrfach phosphoryliertes Peptid welches null- bis dreifach an drei Serinen oder Threoninen phosphoryliert ist, nach Anwendung des Labelingkonzeptes im Extracted-Ion-Chromatogramm darstellen würde. Während die Peptidvarianten im ursprünglichen Zustand verschiedene Retentionszeiten aufweisen, würden nach der Modifikation alle Varianten des Peptids auf einen Peak zusammenfallen. Daraus würde sich der Vorteil ergeben, dass alle Varianten des Peptids im gleichen MS-Spektrum zu detektieren wären, und dass durch die gleichen Ionisierungseffizienzen die Verhältnisse der verschiedenen Spezies direkt aus dem MS-Spektrum zu bestimmen wären.

In Abbildung 8.2 auf Seite 101 sind die theoretischen Massenspektren für die unmodifizierten und modifizierten Peptide dargestellt. Unter der Annahme, dass die verschiedenen Peptidspezies im Verhältnis 1:1:1:1 vorlägen, würde sich wie in der linken Hälfte von

## 8 Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen durch chemisches Labeling

Abbildung 8.2 dargestellt, bei den bisherigen Methoden im MS-Spektrum eine unterschiedliche Signalintensität durch die ungleiche Ionisierungseffizienz bei den verschiedenen Phosphorylierungsgraden ergeben. Nach der chemischen Modifikation würden alle Phosphorylierungsgrade des Peptids die gleiche Ionisierungseffizienz besitzen und das Verhältnis der Grade zueinander wäre direkt aus dem Massenspektrum abzulesen. Dies ist in der rechten Hälfte von Abbildung 8.2 dargestellt.

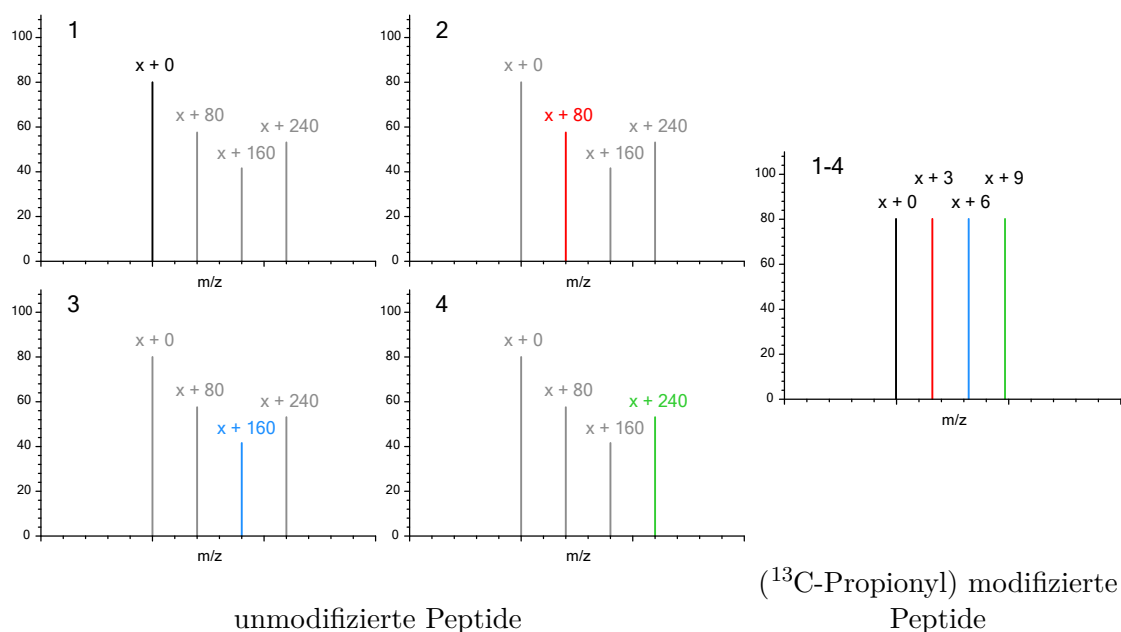


A | Unmodifizierte Phosphopeptide      B | Modifizierte Phosphopeptide

**Abbildung 8.1** – Theoretische Vorteile der Isotopenmarkierung von Serin und Phosphoserin: Nach der Markierung fallen die verschiedenen Phosphorylierungsstufen des Peptids in einen Peak, neben der Veresterung der Serine findet eine Amidierung des N-Terminus statt.

## 8.2 Material und Methoden

Für die Experimente wurden Reagenzien für die Veresterung ausgewählt, welche kommerziell in  $^{13}\text{C}$ -isotopenmarkierten Varianten erhältlich sind. Ameisensäure, Essigsäure, Acetylchlorid, Acetanhydrid, Propionsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid, O-Methylisoharnstoff, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid und Bismuth(III)-triflat wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, USA) gekauft. Cer(III)triflat und Cer(IV)-triflat wurden bei Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland) erworben. Als Testpeptide kamen die Peptidmix A und B, die AQUA-Peptide und die Peptide TWpSL und TWpTV zur Anwendung, als Protein für die Versuche wurde cAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Alpha (PKA) eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen der Firma Roth auf einen Eppendorf Thermoblock durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit dem LC-MS und dem Chipcube-Interface von Agilent am Q-TOF-, 3Q-Massenspektrometer und der ETD-Ionenfalle beziehungsweise mit einer Proxeon Nano-ESI-Quelle (mittlerweile Thermo Fisher Scientific, Walton, MA, USA) am 3Q-Massenspektrometer und der ETD-Ionenfalle.



**Abbildung 8.2** – Theoretische Massenspektren für die 0–3-fach phosphorylierten Peptide bei der chemischen Isotopenmarkierung; bei den unmodifizierten Peptiden (linke Seite) sind die Peptide der verschiedenen Phosphorylierungsgrade in verschiedenen Massenspektren zu finden, besitzen eine unterschiedliche Ionisierungseffizienz und eine Massendifferenz von 79,96 Da. Bei den modifizierten Peptiden (rechte Seite) fallen die Peptide aller Phosphorylierungsstufen in einem MS-Spektrum zusammen, besitzen die gleiche Ionisierungseffizienz und eine Massendifferenz von 3,01 Da.

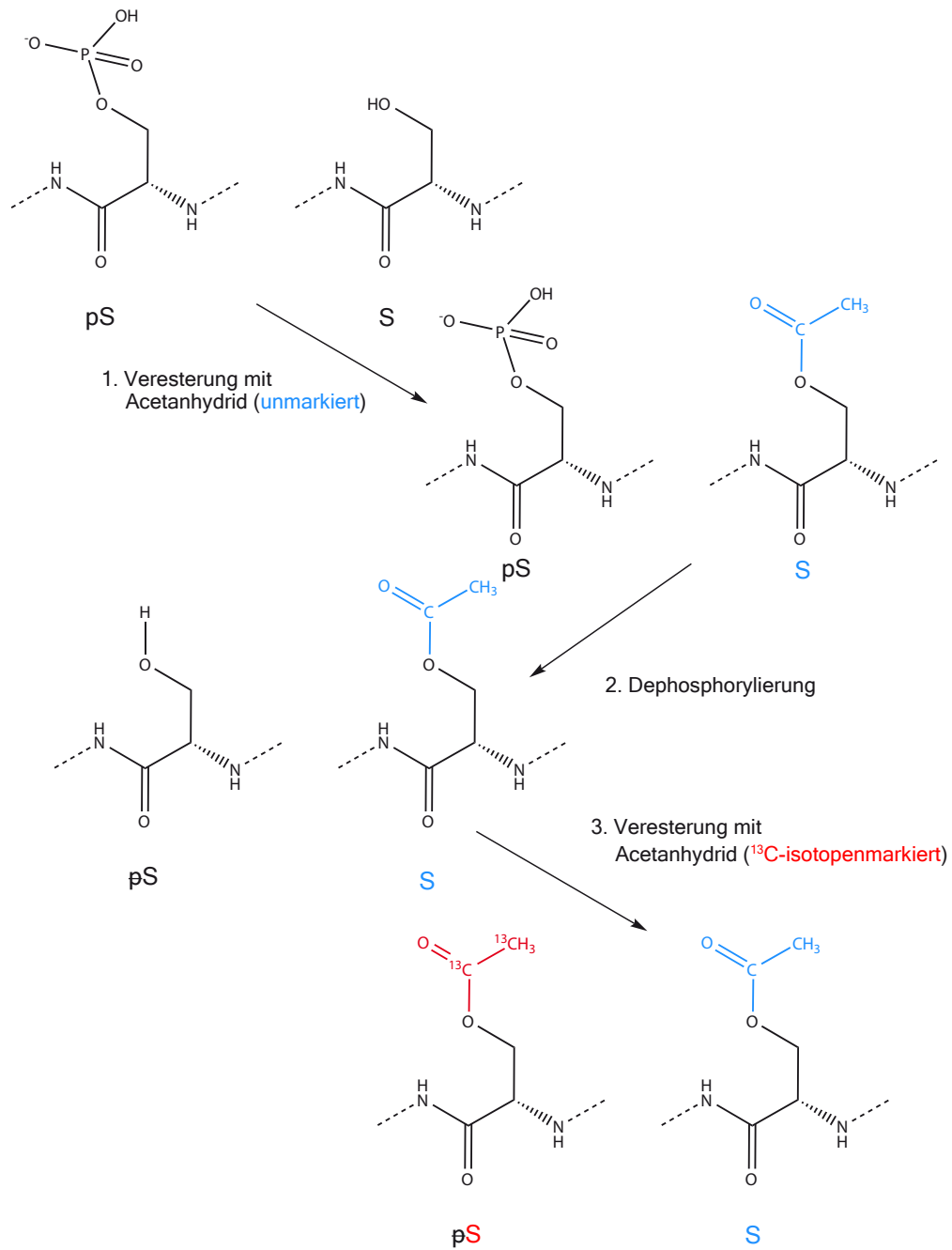
## 8.3 Ergebnisse

### 8.3.1 Guanidierung der freien Lysine mit O-Methylisoharnstoff zum Homoarginin

Da die primäre Aminogruppe der Seitenkette von Lysin eine höhere Reaktivität aufweist als die Hydroxygruppen von Serin und Threonin, welche verestert werden sollen, ist ein Zwischenschritt notwendig, um die Aminogruppe am Lysin unter Beibehaltung ihrer Basizität zu schützen. Die Guanidierungsreaktion wird dabei mit einem Salz von O-Methylisoharnstoff durchgeführt, wobei sich das Hemisulfat als geeigneter als das Hydrogensulfat erwiesen hat (Beardsley und Reilly, 2002).

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Guanidierung steigt mit zunehmendem pH-Wert (Hughes et al., 1949). Als Kompromiss zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Stabilität des Proteins gilt daher ein Bereich von pH 10,5 bis 11. In Abbildung 8.4 auf Seite 103 ist die Guanidierung an Lysin dargestellt. Die Optimierung der Guanidierungsreaktion wurde am Beispiel des Proteins PKA durchgeführt. Die Guanidierung gelang sowohl beim Ansatz in Lösung als auch im SDS-Gel mit hoher Ausbeute.

## 8 Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen durch chemisches Labeling



**Abbildung 8.3** – Konzept der Isotopenmarkierung von Serin und Phosphoserin mit Acetanhydrid: Im ersten Reaktionsschritt werden die freien Hydroxygruppen der unphosphorylierten Serine und Threonine mit einer Carbonsäure verestert. Im zweiten Reaktionsschritt wird die Phosphatgruppe mit Flusssäure abgespalten. Im dritten Reaktionsschritt werden die nun freigesetzten Hydroxygruppen an den ehemaligen Phosphoserinen und -threoninen mit einer isotopenmarkierten Carbonsäure verestert.



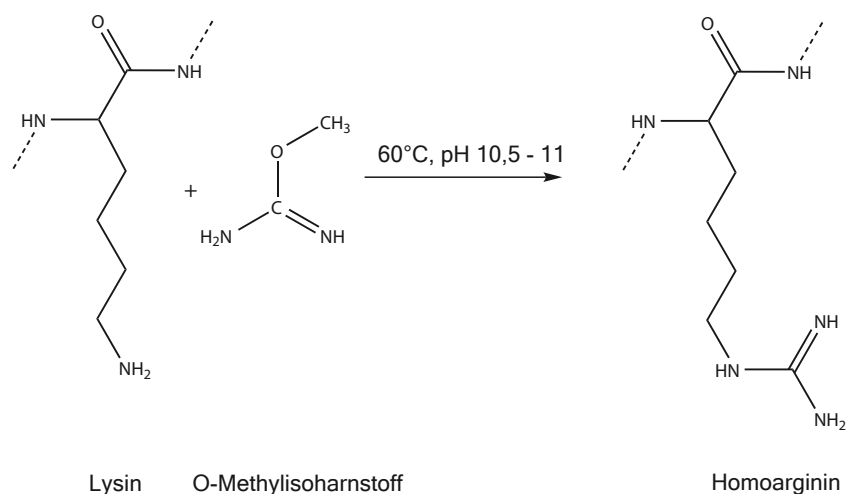


Abbildung 8.4 – Guanidierung von Lysin mit O-Methylisoharnstoff

### In-Lösungs-Guanidierung von PKA

Beim Ansatz in Lösung wurden 20 pmol PKA (in 1,88  $\mu\text{l}$  Aufbewahrungspuffer) mit 7,12  $\mu\text{l}$  0,7 % Sodiumdodecylsulfat in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung pH 11 versetzt. Der pH-Wert der Lösung wurde zuvor mit Ammoniakwasser eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  5 M O-Methylisoharnstoffhemisulfat<sub>(aq)</sub> zur Probe. Der Ansatz wurde 45 Minuten lang auf 60 °C erhitzt und nach dem Abkühlen mit Nupage-Samplebuffer versetzt. Die weitere Probenvorbereitung wurde wie in Abbildung 3.4 auf Seite 38 beschrieben durchgeführt. Die Guanidierung war dabei nahezu vollständig, wie am Beispiel des Phosphopeptids KGpSEQESVKEFLAK in Teil A der Abbildung 8.5 auf Seite 104 zu sehen ist. Die Guanidierung weiterer Peptide von PKA in Lösung ist in Tabelle 8.1 auf Seite 105 aufgeführt. Dabei ist zu beachten, dass das Auftreten von nur teilweise guanidierten Proteinen in der Datenbanksuche nicht die quantitativen Verhältnisse der Reaktionsausbeute widerspiegelt.

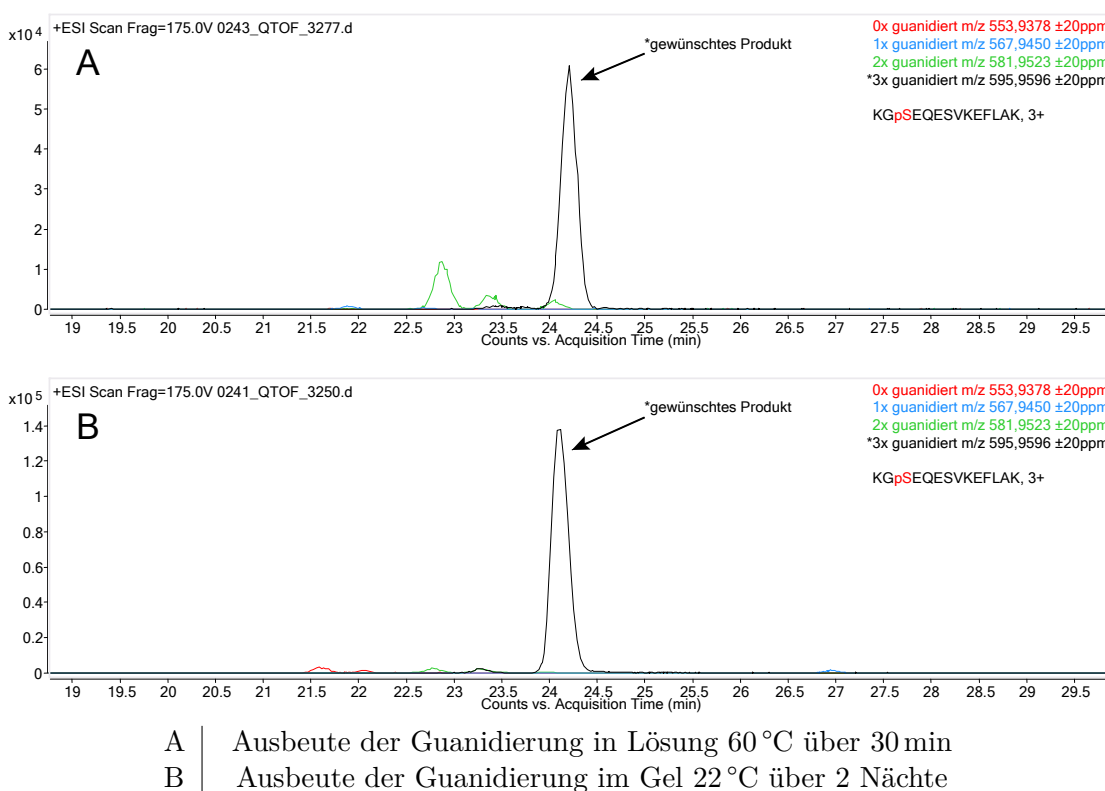
### In-Gel-Guanidierung von PKA

Für die In-Gel-Guanidierung von PKA wurde 20 pmol PKA (mittels ACN getrocknete Gelbände) verwendet. Dieses Gelstück wurde mit 40  $\mu\text{l}$  einer Lösung von 1 M O-Methylisoharnstoff in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 11 gequollen. Die Reaktion in der gequollenen Gelbände fand bei Raumtemperatur über zwei Nächte statt. Anschließend wurde der Überstand entfernt und verworfen. Das Gel wurde anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  einer 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung bei 37 °C und 1100 rpm für 30 Minuten im Eppendorf-Thermomixer gewaschen. Der Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen. Im Anschluss an den ersten Waschschrift folgten zwei weitere Waschschrift mit 100  $\mu\text{l}$  einer Mischung von 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ <sub>(aq)</sub> und Tetrahydrofuran im Verhältnis von 1:1, ebenfalls bei 37 °C und 1100 rpm für 30 Minuten. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Gelbände mit 100  $\mu\text{l}$  Tetrahydrofuran geschrumpft und anschließend im Eppendorf-Concentrator

## 8 Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen durch chemisches Labeling

getrocknet. Danach erfolgte ein tryptischer Verdau der Probe. Die Extraktion vor der LC-MS-Messung erfolgte mit 100 mM Zitronensäure. Bei dem Ansatz im Gel ergab sich ebenfalls eine nahezu vollständige Guanidierung, wie am Beispiel des Phosphopeptids KGpSEQESVKEFLAK in Teil B der Abbildung 8.5 auf Seite 104 zu sehen ist. Die Guanidierung weiterer Peptide von PKA im Gel ist in Tabelle 8.2 auf Seite 106 aufgeführt.

Durch die längere Reaktionsdauer bei der In-Gel-Guanidierung war die Ausbeute noch etwas besser als bei der In-Lösungs-Guanidierung. Die Guanidierung im Gel muss allerdings bei niedrigeren Temperaturen erfolgen als die Guanidierung in Lösung, da bei Temperaturen höher als 50 °C Zersetzungsprozesse des Polyacrylamid-Gels erfolgen.



**Abbildung 8.5** – Guanidierung von PKA mit O-Methylisoharnstoff am Beispiel des Peptids KGpSEQESVKEFLAK; dabei war das Ziel die unterstrichenen Lysine zu guanidieren, die Ausbeute unter den verwendeten Bedingungen ist dabei hoch.

### 8.3.2 Veresterung mit Ameisensäure und *N*-*N*'-Carbonyldiimidazol

Da die Veresterung mit nicht aktivierter Carbonsäure zu geringe Ausbeuten an Ester ergibt, wurde in der ersten Versuchsreihe die verwendete Ameisensäure mit *N*-*N*'-Carbonyldiimidazol, welches als Carbonsäureaktivator dient (Staab, 1956, 1962), aktiviert.

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
9 - 22	427.2308	1704.8942	1704.8942	1704.8907	2	2	K KGSEQSVKEFLAK.A 3 GuanidinyI (K) (Ions score 17)
9 - 22	581.9526	1742.8361	1742.8361	1742.8352	0	2	K KGSEQSVKEFLAK.A Phospho (ST); 2 GuanidinyI (K) (Ions score 66)
9 - 22	595.9619	1784.8639	1784.8639	1784.8570	4	2	K KGSEQSVKEFLAK.A Phospho (ST); 3 GuanidinyI (K) (Ions score 66)
9 - 22	447.2234	1784.8646	1784.8646	1784.8570	4	2	K KGSEQSVKEFLAK.A Phospho (ST); 3 GuanidinyI (K) (Ions score 22)
23 - 29	446.7475	891.4804	891.4804	891.4814	-1	1	K AKEDFLK.K GuanidinyI (K) (Ions score 24)
23 - 29	312.1761	933.5064	933.5064	933.5032	3	1	K AKEDFLK.K 2 GuanidinyI (K) (Ions score 36)
23 - 30	354.8751	1061.6034	1061.6034	1061.5982	5	2	K AKEDFLK.W 2 GuanidinyI (K) (Ions score 18)
30 - 46	702.6724	2104.9954	2104.9954	2104.9926	1	1	K KWETPSQNTAQLDQFDRI.1 GuanidinyI (K) (Ions score 107)
30 - 46	716.6727	2146.9964	2146.9964	2147.0144	-8	1	K KWETPSQNTAQLDQFDRI.1 GuanidinyI (K); GuanidinyI (N-term) (Ions score 53)
31 - 46	968.4492	1934.8839	1934.8839	1934.8759	4	0	K KWETPSQNTAQLDQFDRI.1 GuanidinyI (K) (Ions score 127)
47 - 57	379.5526	1135.6360	1135.6360	1135.6350	1	1	R IKTLGTGSFGR.V (Ions score 17)
47 - 57	589.8368	1177.6591	1177.6591	1177.6568	2	1	R IKTLGTGSFGR.V GuanidinyI (K) (Ions score 64)
47 - 57	393.5604	1177.6593	1177.6593	1177.6568	2	1	R IKTLGTGSFGR.V GuanidinyI (K) (Ions score 54)
47 - 57	407.5628	1219.6665	1219.6665	1219.6786	-10	1	R IKTLGTGSFGR.V GuanidinyI (K); GuanidinyI (N-term) (Ions score 39)
47 - 57	420.2142	1257.6208	1257.6208	1257.6231	-2	1	R IKTLGTGSFGR.V Phospho (ST); GuanidinyI (K) (Ions score 54)
47 - 57	629.8199	1257.6253	1257.6253	1257.6231	2	1	R IKTLGTGSFGR.V Phospho (ST); GuanidinyI (K) (Ions score 42)
49 - 57	488.2200	974.4254	974.4254	974.4223	3	0	K TLGTGSFGR.V Phospho (ST) (Ions score 27)
58 - 62	316.2021	630.3896	630.3896	630.3887	1	0	R VMLVK.H GuanidinyI (K) (Ions score 32)
58 - 62	345.2048	688.3950	688.3950	688.4054	-15	0	R VMLVK.H Oxidation (M); GuanidinyI (K); GuanidinyI (N-term) (Ions score 29)
58 - 62	345.2051	688.3957	688.3957	688.4054	-14	0	R VMLVK.H Oxidation (M); GuanidinyI (K); GuanidinyI (N-term) (Ions score 20)
83 - 93	465.5992	1393.7759	1393.7759	1393.7677	6	1	K LKQIEHTLNEKR.I GuanidinyI (K) (Ions score 23)
83 - 94	388.4751	1549.8713	1549.8713	1549.8688	2	2	K LKQIEHTLNEKR.I GuanidinyI (K) (Ions score 18)
83 - 94	531.6375	1591.8906	1591.8906	1591.8906	-0	2	K LKQIEHTLNEKR.I 2 GuanidinyI (K) (Ions score 27)
83 - 94	398.9805	1591.8927	1591.8927	1591.8906	1	2	K LKQIEHTLNEKR.I 2 GuanidinyI (K) (Ions score 46)
85 - 94	431.5622	1291.6647	1291.6647	1291.6633	1	1	K QIEHTLNEKR.I Glu->pyro-Glu (N-term Q); GuanidinyI (K) (Ions score 25)
85 - 94	437.2378	1308.6915	1308.6915	1308.6898	1	1	K QIEHTLNEKR.I GuanidinyI (K) (Ions score 57)
85 - 94	328.1804	1308.6924	1308.6924	1308.6898	2	1	K QIEHTLNEKR.I GuanidinyI (K) (Ions score 35)
95 - 106	694.9191	1387.8237	1387.8237	1387.8228	1	0	R ILQAVNFPFLVK.L (Ions score 43)
135 - 145	469.2333	1404.6780	1404.6780	1404.6776	0	2	R IGRFSEPHAR.F Phospho (ST) (Ions score 39)
136 - 145	625.2972	1248.5798	1248.5798	1248.5764	3	1	R IGRFSEPHAR.F Phospho (ST) (Ions score 40)
136 - 145	431.2043	1290.5910	1290.5910	1290.5982	-6	1	R IGRFSEPHAR.F Phospho (ST); GuanidinyI (N-term) (Ions score 32)
139 - 145	443.2152	884.4158	884.4158	884.4253	-11	0	R FSEPHAR.F GuanidinyI (N-term) (Ions score 25)
258 - 267	388.8605	1163.5598	1163.5598	1163.5611	-1	0	R FSPHSFSLDK.D (Ions score 33)
272 - 280	522.3090	1042.6035	1042.6035	1042.6022	1	0	R NLLQVDTLTK.R (Ions score 37)
272 - 281	400.5761	1198.7065	1198.7065	1198.7034	3	1	R NLLQVDTLTK.R.F (Ions score 42)
272 - 281	621.3710	1240.7274	1240.7274	1240.7252	2	1	R NLLQVDTLTK.R.F GuanidinyI (K) (Ions score 52)
272 - 281	414.5834	1240.7285	1240.7285	1240.7252	3	1	R NLLQVDTLTK.R.F GuanidinyI (K) (Ions score 43)
272 - 281	428.5861	1282.7364	1282.7364	1282.7469	-8	1	R NLLQVDTLTK.R.F GuanidinyI (K); GuanidinyI (N-term) (Ions score 42)
310 - 318	343.5418	1027.6037	1027.6037	1027.6066	-3	1	R KVEAPFIPK.F (Ions score 16)
310 - 318	535.8219	1069.6293	1069.6293	1069.6284	1	1	R KVEAPFIPK.F GuanidinyI (K) (Ions score 37)
310 - 318	357.5505	1069.6298	1069.6298	1069.6284	1	1	R KVEAPFIPK.F GuanidinyI (K) (Ions score 29)
310 - 318	556.8338	1111.6529	1111.6529	1111.6502	2	1	R KVEAPFIPK.F 2 GuanidinyI (K) (Ions score 46)
310 - 318	371.5588	1111.6546	1111.6546	1111.6502	4	1	R KVEAPFIPK.F 2 GuanidinyI (K) (Ions score 47)
310 - 318	385.5593	1153.6562	1153.6562	1153.6720	-14	1	R KVEAPFIPK.F 2 GuanidinyI (K); GuanidinyI (N-term) (Ions score 20)
310 - 318	385.5606	1153.6600	1153.6600	1153.6720	-10	1	R KVEAPFIPK.F 2 GuanidinyI (K); GuanidinyI (N-term) (Ions score 45)
310 - 320	347.7111	1386.8153	1386.8153	1386.8136	1	2	R KVEAPFIPK.G 2 GuanidinyI (K) (Ions score 21)
311 - 318	471.7748	941.5350	941.5350	941.5334	2	0	K KVEAPFIPK.F GuanidinyI (K) (Ions score 47)

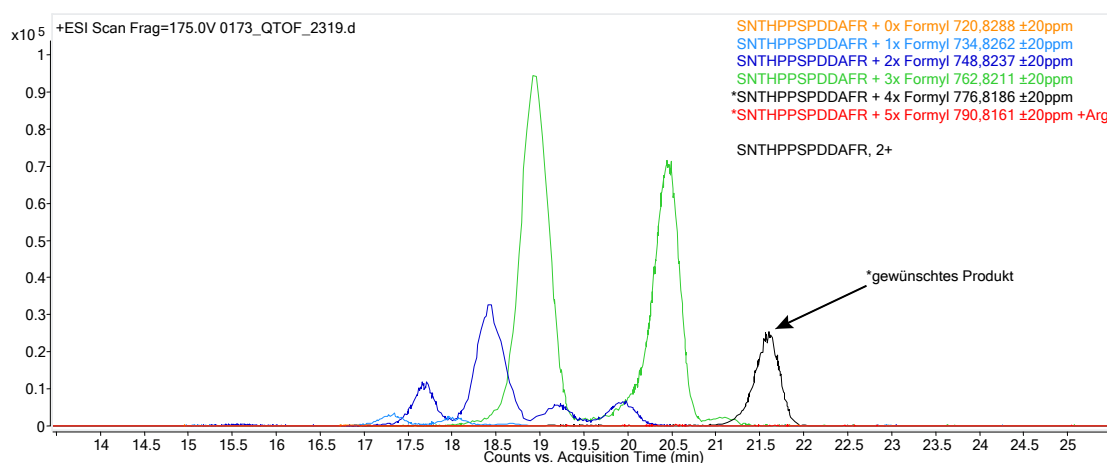
Tabelle 8.1 – Auszug aus den Mascot-Suchergebnissen lysinhaltiger Peptide der Guanidierung von PKA in Lösung

# 8 Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen durch chemisches Labeling

Start , End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
23 - 29	467.7569	933.5053	933.5032	2	1	K.AKEDFLK.K 2 GuanidinyI (K) (Ions score 35)
23 - 29	312.1758	933.5055	933.5032	2	1	K.AKEDFLK.K 2 GuanidinyI (K) (Ions score 32)
30 - 46	702.6737	2104.9994	2104.9926	3	1	K.KWETPSQNTAQLDQFDR.I GuanidinyI (N-term) (Ions score 106)
31 - 46	645.9665	1934.8777	1934.8759	1	0	K.KWETPSQNTAQLDQFDR.I (Ions score 69)
31 - 46	968.4463	1934.8780	1934.8759	1	0	K.KWETPSQNTAQLDQFDR.I (Ions score 116)
47 - 57	589.8363	1177.6581	1177.6568	1	1	R.IKTLGTGSGR.V GuanidinyI (K) (Ions score 61)
47 - 57	393.5607	1177.6602	1177.6568	3	1	R.IKTLGTGSGR.V GuanidinyI (K) (Ions score 53)
47 - 57	629.8193	1257.6240	1257.6231	1	1	R.IKTLGTGSGR.V GuanidinyI (K); Phospho (ST) (Ions score 27)
47 - 57	420.2106	1257.6279	1257.6231	4	1	R.IKTLGTGSGR.V GuanidinyI (K); Phospho (ST) (Ions score 40)
49 - 57	448.2360	894.4574	894.4559	2	0	K.TLGTGSGFR.V (Ions score 62)
58 - 62	316.2031	630.3916	630.3887	5	0	R.VMLIVK.H GuanidinyI (K) (Ions score 30)
58 - 62	324.1994	646.3843	646.3836	1	0	R.VMLIVK.H GuanidinyI (K); Oxidation (M) (Ions score 22)
83 - 93	465.5967	1393.7684	1393.7677	0	1	K.LKQEHHTLNEK.R GuanidinyI (N-term) (Ions score 61)
83 - 93	349.4501	1393.7714	1393.7677	3	1	K.LKQEHHTLNEK.R GuanidinyI (K) (Ions score 27)
85 - 93	371.1984	1110.5734	1110.5669	6	0	K.QEHHTLNEK.R (Ions score 26)
85 - 94	423.2296	1266.6671	1266.6680	-1	1	K.QEHHTLNEK.R.I (Ions score 18)
85 - 94	431.5628	1291.6665	1291.6633	2	1	K.QEHHTLNEK.R.I Glu->pyro-Glu (N-term Q); GuanidinyI (K) (Ions score 22)
85 - 94	437.2368	1308.6885	1308.6898	-1	1	K.QEHHTLNEK.R.I GuanidinyI (K) (Ions score 41)
85 - 94	328.1804	1308.6927	1308.6898	2	1	K.QEHHTLNEK.R.I GuanidinyI (K) (Ions score 22)
95 - 106	463.6160	1387.8262	1387.8228	2	0	R.IIQAVNPFVLK.L (Ions score 32)
95 - 106	694.9212	1387.8278	1387.8228	4	0	R.IIQAVNPFVLK.L (Ions score 59)
107 - 112	385.7082	769.4019	769.4010	1	0	K.LIEFSFK.D (Ions score 34)
136 - 145	625.2983	1248.5820	1248.5764	4	1	R.IGRFSEPHAR.F Phospho (ST) (Ions score 19)
136 - 145	417.2015	1248.5827	1248.5764	5	1	R.IGRFSEPHAR.F Phospho (ST) (Ions score 44)
136 - 145	313.1535	1248.5847	1248.5764	7	1	R.IGRFSEPHAR.F Phospho (ST) (Ions score 23)
139 - 145	422.2111	842.4076	842.4035	5	0	R.FSEPHAR.F (Ions score 30)
196 - 214	758.0399	2271.0979	2271.0898	4	0	R.TWTLGTPPEYLAPHLLSK.G Carbamidomethyl (C); Phospho (ST) (Ions score 25)
258 - 267	582.7892	1163.5639	1163.5611	2	0	R.FPSHFSSDLK.D (Ions score 48)
258 - 267	388.8620	1163.5642	1163.5611	3	0	R.FPSHFSSDLK.D (Ions score 47)
258 - 271	426.7280	1702.8828	1702.8791	3	1	R.FPSHFSSDLKDLR.N GuanidinyI (K) (Ions score 48)
258 - 271	568.6357	1702.8853	1702.8791	4	1	R.FPSHFSSDLKDLR.N GuanidinyI (K) (Ions score 24)
272 - 280	522.3101	1042.6056	1042.6022	3	0	R.NLLQVDLTR.R (Ions score 31)
272 - 281	400.5788	1198.7057	1198.7034	2	1	R.NLLQVDLTR.R (Ions score 36)
272 - 281	414.5830	1240.7273	1240.7252	2	1	R.NLLQVDLTR.R.F GuanidinyI (K) (Ions score 48)
272 - 281	621.3713	1240.7281	1240.7252	2	1	R.NLLQVDLTR.R.F GuanidinyI (K) (Ions score 44)
310 - 318	343.5438	1027.6096	1027.6066	3	1	R.KVEAPEIPK.F (Ions score 26)
310 - 318	535.8284	1069.6322	1069.6284	4	1	R.KVEAPEIPK.F GuanidinyI (K) (Ions score 47)
310 - 318	357.5621	1069.6344	1069.6284	6	1	R.KVEAPEIPK.F GuanidinyI (K) (Ions score 34)
310 - 318	556.8342	1111.6559	1111.6502	3	1	R.KVEAPEIPK.F 2 GuanidinyI (K) (Ions score 25)
310 - 318	371.5593	1111.6559	1111.6502	5	1	R.KVEAPEIPK.F GuanidinyI (K); GuanidinyI (N-term) (Ions score 50)
311 - 318	471.7751	941.5357	941.5334	2	0	K.VEAPFIPK.F GuanidinyI (K) (Ions score 61)
319 - 337	764.0031	2288.9874	2288.9822	2	1	K.FKGPEDITSNPDYEEIEER.V GuanidinyI (N-term) (Ions score 72)

**Tabelle 8.2** – Auszug aus den Mascot-Suchergebnissen lysinhaltiger Peptide der Guanidierung von PKA im Gel

Dazu wurden *N-N'*-Carbonyldiimidazol und Ameisensäure im Verhältnis 1:1 mol gemischt und der Ansatz über zwei Tage bei 37 °C inkubiert. *N-N'*-Carbonyldiimidazol reagiert mit dem Alkohol zum aktivierten Imidazolid und Imidazol unter CO<sub>2</sub>-Freisetzung. Anschließend wurden 1,25 pmol des Aqua-Peptids SNTHPPSPDDAFR in 4 µl 5 % Trifluoressigsäure (TFA) gelöst. Die Reaktion mit 10 µl der Imidazolidlösung fand für eine Stunde bei 50 °C statt. Der Ansatz wurde im Eppendorf-Concentrator getrocknet und mit 10 µl 0,1 % FA 3 % ACN aufgenommen und anschließend am Q-TOF gemessen. Wie aus Abbildung 8.6 auf Seite 107 und aus Tabelle 8.3 auf Seite 109 ersichtlich ist, ist die Formylierung der Serine und Threonine unter den vorliegenden Bedingungen nicht vollständig. Es findet zudem ein geringer Anteil an intramolekularer Wasserabspaltung statt. Es wurde daher versucht, die Reaktionsbedingungen zu optimieren, um so das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung der Produkte zu verschieben. Bei der Tabledarstellung ist zu beachten, dass diese Form aufgrund der Übersichtlichkeit gewählt wurde und die Mascot-Scores nicht direkt mit der Peakintensität im Chromatogramm korrelieren.



**Abbildung 8.6** – Veresterungsprodukte des Peptids SNTHPPSPDDAFR mit Ameisensäure und *N-N'*-Carbonyldiimidazol; die unterstrichenen Aminosäuren sind mögliche Ansatzpunkte der Veresterung und der Amidierung. Das N-terminale Serin kann auch am N-Terminus unter Amidbildung reagieren (zweiter Unterstrich). Es ist zu erkennen, dass die Ausbeute der Reaktion relativ gering ist. Eine Reaktion am Arginin trat nicht auf.

### 8.3.3 Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid und Pyridin

Als eine Standardmethode zur Veresterung unter milden Bedingungen wird die Umsetzung von Hydroxygruppen mit Carbonsäureanhydrid und Pyridin zum Binden von freierwerdender Säure verwendet (Verley und Bölsing, 1901). Dazu wurde Bernsteinsäureanhydrid in Pyridin in einer Konzentration von 0,5 M gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden zu 1,25 pmol des getrockneten Aqua-Peptids SNTHPPSPDDAFR gegeben. Die Reaktion

fand bei 45 °C über Nacht statt. Der Ansatz wurde in Eppendorf-Concentrator getrocknet, mit 10 µl 0,1 % FA 3 % ACN aufgenommen und anschließend am Q-TOF gemessen.

Wie in Tabelle 8.4 auf Seite 109 ersichtlich ist, ist die Succinylierung der Serine und Threonine unter den Bedingungen ebenfalls nicht vollständig. Zudem ergibt sich bei Bernsteinsäureanhydrid aufgrund des hohen Siedepunkts von 261 °C die Problematik, dieses wieder aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, was für den dritten Reaktionsschritt des Labelingkonzeptes (siehe Abbildung 8.3 auf Seite 102) notwendig wäre. Außerdem ist als unerwünschte Nebenreaktion die Succinylierung von Arginin zu beobachten, siehe Teil A der Abbildung 8.7 auf Seite 111. Diese ist als kritisch zu bewerten, da durch die Succinylierung am Arginin die Lokalisierung der positiven Ladung beeinträchtigt wird, was negative Effekte für die Ionisierung und die Fragmentierung im Massenspektrometer mittels CID erwarten lässt.

### 8.3.4 Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid und Trifluoressigsäure in Tetrahydrofuran

Bei der säurekatalysierten Veresterung bestand der Reaktionsansatz aus 20 µl 0,5 M Bernsteinsäureanhydrid in wasserfreiem Tetrahydrofuran, weiteren 20 µl Tetrahydrofuran und 2 µl Trifluoressigsäure. Der gesamte Ansatz wurde auf 1,25 pmol des getrockneten Aqua-Peptids SNTHPPSPDDAFR gegeben. Die Reaktion fand bei 50 °C über Nacht statt. Der Ansatz wurde in Eppendorf-Concentrator getrocknet, mit 20 µl 0,1 % FA 3 % ACN aufgenommen und anschließend am Q-TOF gemessen. Bei sauren pH-Werten ist die Nebenreaktion am Arginin, vermutlich aufgrund der dann protonierten Guanidin-Gruppe, stark unterdrückt, siehe Tabelle 8.5 auf Seite 110. Jedoch war die Ausbeute des gewünschten Produkts niedriger als bei der Reaktion mit Pyridin. Durch den Austausch der Trifluoressigsäure durch Essigsäure konnte die Ausbeute des gewünschten Produkts jedoch verbessert werden, siehe Teil B in Abbildung 8.7 auf Seite 111.

### 8.3.5 Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid und Essigsäure in Tetrahydrofuran mit anschließender Dephosphorylierung

Um zu kontrollieren, ob das in Abbildung 8.3 gezeigte Labelingkonzept funktionieren kann, wurde überprüft, ob die Veresterung einer Dephosphorylierung mittels 70 % Flusssäure in Pyridin, dem zweiten Reaktionsschritt, standhält. Der Reaktionsansatz setzte sich hierbei aus 40 µl 0,25 M Bernsteinsäureanhydrid in Tetrahydrofuran und 2 µl konzentrierter Essigsäure zusammen, welche wiederum auf 1,25 pmol des getrockneten Aqua-Peptids SNTHPPSPDDAFR gegeben wurden. Die Reaktion fand bei 50 °C über Nacht statt. Anschließend wurde der Ansatz im Eppendorf-Concentrator getrocknet. Zur Dephosphorylierung wurde zur getrockneten Probe 20 µl 70 % Flusssäure in Pyridin gegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur zwei Stunden inkubiert. Danach wurde die Flusssäure durch Trocknen im Eppendorf-Concentrator entfernt und in einer Waschflasche mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung neutralisiert. Das getrocknete Peptid wurde mit 20 µl 100 mM Zitronensäure aufgenommen und am Q-TOF gemessen. Aus Tabelle 8.6 auf Seite 110 geht hervor, dass die Phosphorylierung am zweiten Serin des Peptids quantitativ entfernt

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
151	480.8925	1439.656	1439.643	8.87	0	(30)	0.009	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.-
157	734.8283	1467.642	1467.638	2.8	0	(37)	0.0014	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Formyl-ST (ST)
158	734.8292	1467.644	1467.638	4.03	0	(22)	0.044	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Formyl-ST (ST)
159	490.2227	1467.646	1467.638	5.64	0	(93)	3.40E-09	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Formyl-ST (ST)
160	490.2247	1467.652	1467.638	9.73	0	(39)	0.0012	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Formyl-ST (ST)
161	493.5512	1477.632	1477.622	6.46	0	(85)	3.70E-08	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Dehydrated (DE); 2 Formyl-ST (ST)
169	748.8266	1495.639	1495.633	3.91	0	(55)	2.60E-05	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Formyl-ST (ST); Formyl (N-term)
170	499.5552	1495.644	1495.633	7.32	0	(39)	0.0012	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + 2 Formyl-ST (ST)
171	499.5554	1495.645	1495.633	7.8	0	97	1.80E-09	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + 2 Formyl-ST (ST)
174	753.8169	1505.619	1505.617	1.35	0	(28)	0.015	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Dehydrated (DE); 2 Formyl-ST (ST); Formyl (N-term)
176	753.8202	1505.626	1505.617	5.71	0	(31)	0.0083	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Dehydrated (DE); 2 Formyl-ST (ST); Formyl (N-term)
177	502.8841	1505.631	1505.617	8.87	0	(47)	0.0002	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Dehydrated (DE); 3 Formyl-ST (ST)
179	762.8255	1523.636	1523.628	5.69	0	(66)	1.80E-06	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + 2 Formyl-ST (ST); Formyl (N-term)
180	508.8878	1523.642	1523.628	9.09	0	(45)	0.00023	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + 3 Formyl-ST (ST)
186	776.8216	1551.629	1551.623	3.86	0	(62)	3.10E-06	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + 3 Formyl-ST (ST); Formyl (N-term)

Tabelle 8.3 – Mascot-Suchergebnisse der Formylierung von SNTHTPPSPDDDAFR mit Ameisensäure und *N*-*N*'-Carbonyldiimidazol

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
163	770.8402	1539.666	1539.659	4.4	0	(17)	0.19	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Succinyl (RST)
195	820.8494	1639.684	1639.675	5.62	0	(31)	0.007	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Succinyl (N-term); Succinyl (RST)
223	870.8538	1739.693	1739.691	1.17	0	(32)	0.0042	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Succinyl (N-term); 2 Succinyl (RST)
224	870.8545	1739.694	1739.691	1.93	0	68	1.30E-06	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Succinyl (N-term); 2 Succinyl (RST)
251	911.8603	1821.706	1821.697	5.17	0	(33)	0.0026	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Succinyl (N-term); 3 Succinyl (RST); Dehydrated (DE)
252	920.8648	1839.715	1839.707	4.28	0	(62)	3.20E-06	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Succinyl (N-term); 3 Succinyl (RST)
253	614.2465	1839.718	1839.707	5.81	0	(48)	8.90E-05	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Succinyl (N-term); 3 Succinyl (RST)
276	961.8662	1921.718	1921.713	2.76	0	(13)	0.15	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Succinyl (N-term); 4 Succinyl (RST); Dehydrated (DE)
280	970.8756	1939.737	1939.723	6.98	0	(58)	5.50E-06	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Succinyl (N-term); 4 Succinyl (RST)
281	647.5873	1939.74	1939.723	8.65	0	(29)	0.0047	1	U	-SNTHTPPSPDDDAFR.- + Succinyl (N-term); 4 Succinyl (RST)

Tabelle 8.4 – Mascot-Suchergebnisse der Succinylierung von SNTHTPPSPDDDAFR mit Bernsteinsäureanhydrid in Pyridin

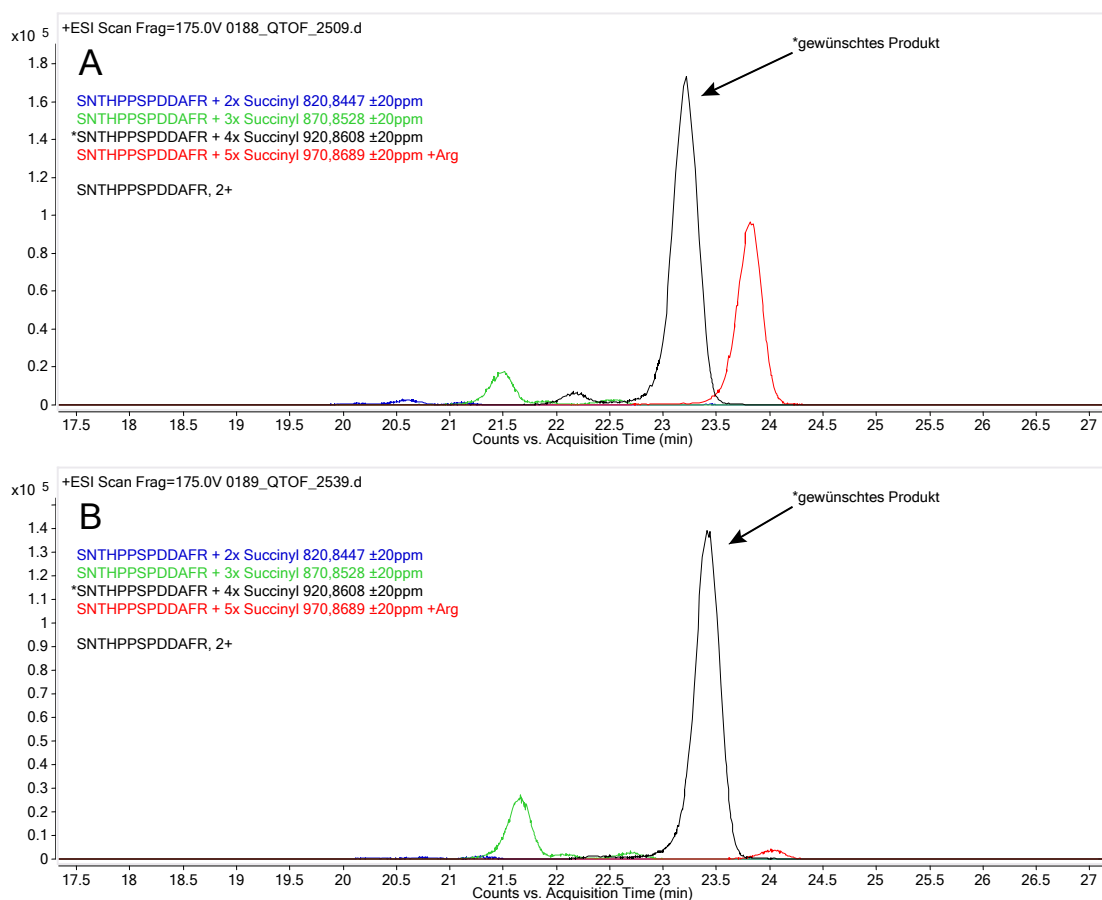
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
251	770.8403	1539.666	1539.659	4.54	0	(30)	0.012	1	U	-SNTHPSPDDAFR.- + Succinyl (RST)
302	820.8492	1639.684	1639.675	5.39	0	(16)	0.3	1	U	-SNTHPSPDDAFR.- + Succinyl (RST); Succinyl (N-term)
335	870.8554	1739.696	1739.691	2.94	0	31	0.008	1	U	-SNTHPSPDDAFR.- + 2 Succinyl (RST); Succinyl (N-term)

**Tabelle 8.5** – Mascot-Suchergebnisse der Succinylierung von SNTHPSPDDAFR mit Bernsteinsäureanhydrid und Trifluoresigsäure in Tetrahydrofuran

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
372	813.3228	1624.631	1624.628	1.99	0	(13)	3.4	1	U	-SNTHPSPDDAFR.- + Succinyl (N-term); Dehydrated (DE); 2 Succinyl (RST)
377	822.3296	1642.645	1642.638	3.85	0	(47)	0.0012	1	U	-SNTHPSPDDAFR.- + Succinyl (N-term); 2 Succinyl (RST)
378	822.3315	1642.648	1642.638	6.14	0	(24)	0.25	1	U	-SNTHPSPDDAFR.- + Succinyl (N-term); 2 Succinyl (RST)
395	863.331	1724.647	1724.644	2.1	0	(36)	0.018	1	U	-SNTHPSPDDAFR.- + Succinyl (N-term); Dehydrated (DE); 3 Succinyl (RST)
396	863.3332	1724.652	1724.644	4.71	0	(13)	3.7	1	U	-SNTHPSPDDAFR.- + Succinyl (N-term); Dehydrated (DE); 3 Succinyl (RST)
398	881.8934	1742.658	1742.654	2.33	0	(34)	0.027	1	U	-SNTHPSPDDAFR.- + Succinyl (N-term); 3 Succinyl (RST)
399	872.3381	1742.662	1742.654	4.21	0	64	3.20E-05	1	U	-SNTHPSPDDAFR.- + Succinyl (N-term); 3 Succinyl (RST)

**Tabelle 8.6** – Mascot-Suchergebnisse der Succinylierung von SNTHPSPDDAFR mit Bernsteinsäureanhydrid und Bernsteinensäure in Tetrahydrofuran und anschließender Dephosphorylierung mit Flußsäure





A | Produkte der Reaktion mit Succinanhydrid in Pyridin  
 B | Produkte der Reaktion mit Succinanhydrid und Essigsäure  
     in Tetrahydrofuran

**Abbildung 8.7** – Veresterungsprodukte des Peptids SNTHPPSPDDAFR bei verschiedenen pH-Werten; die unterstrichenen Aminosäuren sind mögliche Ansatzpunkte der Veresterung und der Amidierung. Das N-terminale Serin kann auch am N-Terminus unter Amidbildung reagieren (zweiter Unterstrich). Bei dem Ansatz ist eine relativ gute Ausbeute zu beobachten, es tritt jedoch bei basischen pH-Werten eine Nebenreaktion am Arginin auf.

wird, die Succinylierung hingegen scheint stabil zu sein. Es sind jedoch auch Veresterungen am bislang phosphorylierten Serin zu beobachten. Dies kann vermutlich dadurch erklärt werden, dass im Ansatz noch überschüssiges Bernsteinsäureanhydrid vorhanden ist, welches das freiwerdende Serin succinyliert. Damit konnte gezeigt werden, dass die ersten beiden Schritte des Labelingkonzeptes funktionieren, allerdings sind die Ausbeuten der verwendeten Reaktionen noch zu niedrig.

### 8.3.6 Veresterung mit Acetanhydrid bzw. Acetylchlorid und Pyridin

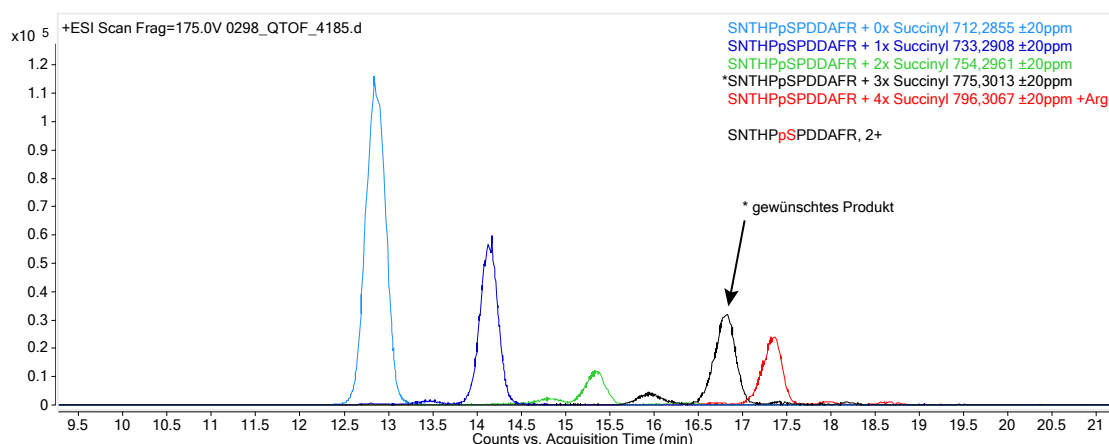
Da die vorhergehenden Versuche zur Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid in keiner ausreichenden Ausbeute resultierten und die Bernsteinsäure schwierig aus dem Reaktionsansatz zu entfernen war, wurden Ansätze der Veresterungsreaktion mit Acetanhydrid in Pyridin und Acetylchlorid durchgeführt. Bei der Veresterung mit Acetanhydrid und Pyridin war jedoch die Ausbeute an gewünschtem Produkt schlechter als bei der Verwendung von Bernsteinsäureanhydrid. Bei der Verwendung von Acetylchlorid fand die Nebenreaktion am Arginin verstärkt statt, sodass dieser Ansatz ebenfalls verworfen wurde.

### 8.3.7 Steglich-Veresterung mit Acetanhydrid und 4-Pyrrolidinopyridin und *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid

Es wurde von Litvinenko und Kirichenko (1967) und Höfle et al. (1978) gezeigt, dass 4-Dialkylaminopyridine, wie 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) und 4-Pyrrolidinopyridin (PPY), als hochwirksame Acylierungskatalysatoren dienen können. Der von uns für die Veresterung von Peptiden verwendete Reaktionsansatz bestand aus 13 µl Acetanhydrid und 38 µl 123 µM 4-Pyrrolidinopyridin in wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) und 2 µl 2 mM *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid in wasserfreiem Tetrahydrofuran. Der Ansatz wurde auf 10 pmol des getrockneten Aqua-Peptids SNTHPpSPDDAFR gegeben und bei 35 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Eintrocknen im Eppendorf-Concentrator wurde die Probe in 0,6 µl ACN und 4,4 µl 0,1 % FA aufgenommen und 30 Sekunden im Ultraschallbad gelöst. Im Anschluss wurde das Peptid mit 5 µl 0,1 % FA und 1 µl 1 M Zitronensäure verdünnt und am Q-TOF gemessen. Wie in Abbildung 8.8 auf Seite 113 zu sehen ist, brachte dieser Ansatz eine schlechte Ausbeute und Nebenreaktionen am Arginin mit sich, so dass er nicht weiter verfolgt wurde.

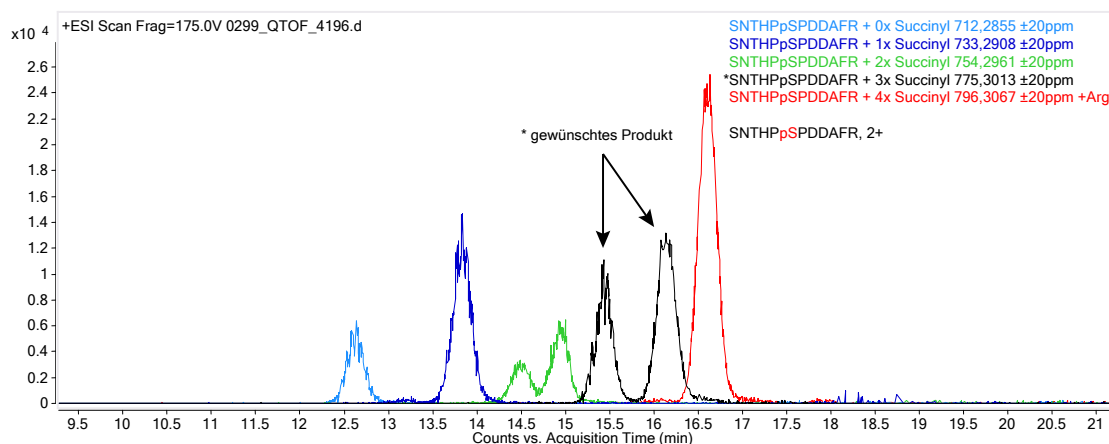
### 8.3.8 Lewis-Säure-katalysierte Veresterung

Von Iranpoor und Shekarriz (1999) wurde entdeckt, dass sich Cer(IV)-Triflat zur milden Veresterung von Alkoholen bei Raumtemperatur eignet. Dabei wurden bei Einsatz von 30–50 mol %  $\text{Ce}(\text{OTf})_4$  bei der Veresterung primärer, sekundärer und tertiärer Alkohole Ausbeuten von bis zu 90 % bei einer Reaktionsdauer von unter 3 Stunden erreicht. Orita et al. (2000) benutzten Bismuth(III)-Triflat um primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole in Acetanhydrid zu verestern.  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  ist an der Luft stabil und dabei im Vergleich zu Trimethylsilyltriflat nicht zu sauer für die Anwendung an säureempfindlichen Substanzen.  $\text{Bi}(\text{OTf})_3$  wurde als Katalysator in Mengen von 0,005 bis 0,5 mol % eingesetzt und erreichte bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C und einer Reaktionsdauer von unter 24 Stunden Produktausbeuten von über 90 %. Weitere Triflate von Lanthanoidmetallen wurden inzwischen für Veresterungen eingesetzt. Garaleh et al. (2009) fanden heraus, dass die Ausbeute bei der triflatkatalysierten Veresterung unabhängig von den pH-Werten der Lanthanoidtriflate in Lösung ist und dass der Reaktionsmechanismus vermutlich nicht über einen protonenkatalysierten Mechanismus verläuft. So ergaben



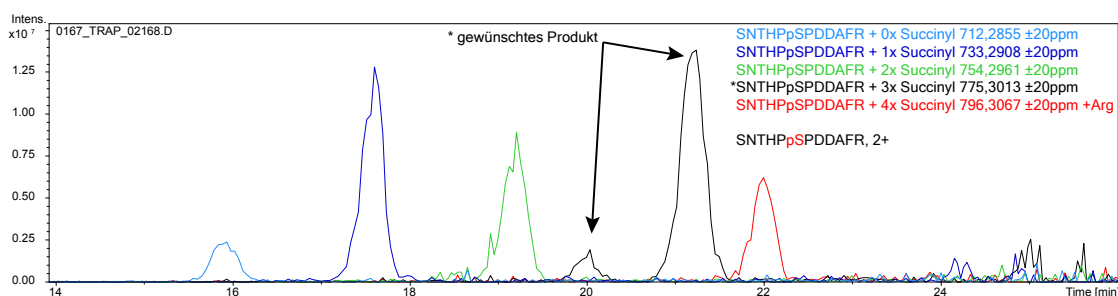
**Abbildung 8.8** – Veresterungsprodukte des Peptids STHPpSPDDAFR mit Acetanhydrid, PPY und DCC; Unterstrichene Aminosäuren können dabei verestert sein, die Reaktion am Arginin ist aufgrund des Basizitätsverlustes unerwünscht. Das N-terminale Serin kann auch am N-Terminus unter Amidbildung reagieren (zweiter Unterstrich); das gewünschte Produkt der Reaktion ist zweifach verestert und einmal amidiert.

auch die Triflate von Lanthan und Samarium gute Ausbeuten bei der Polykondensation, obwohl der pH-Wert ihrer Triflate eher im neutralen Bereich (pH 6,95–8,07) liegt.



**Abbildung 8.9** – Veresterungsprodukte des Peptids STHPpSPDDAFR mit Acetanhydrid in THF mit Bismuthtriflat; unterstrichene Aminosäuren können verestert sein. Die Reaktion am Arginin ist aufgrund des Basizitätsverlustes unerwünscht. Das N-terminale Serin kann auch am N-Terminus unter Amidbildung reagieren (zweiter Unterstrich); die Auftrennung der Peaks am gewünschten Produkt deutet darauf hin, dass die Reaktion bis zum vierfach succinyliertem Produkt über unterschiedliche Zwischenschritte verläuft.

## 8 Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen durch chemisches Labeling

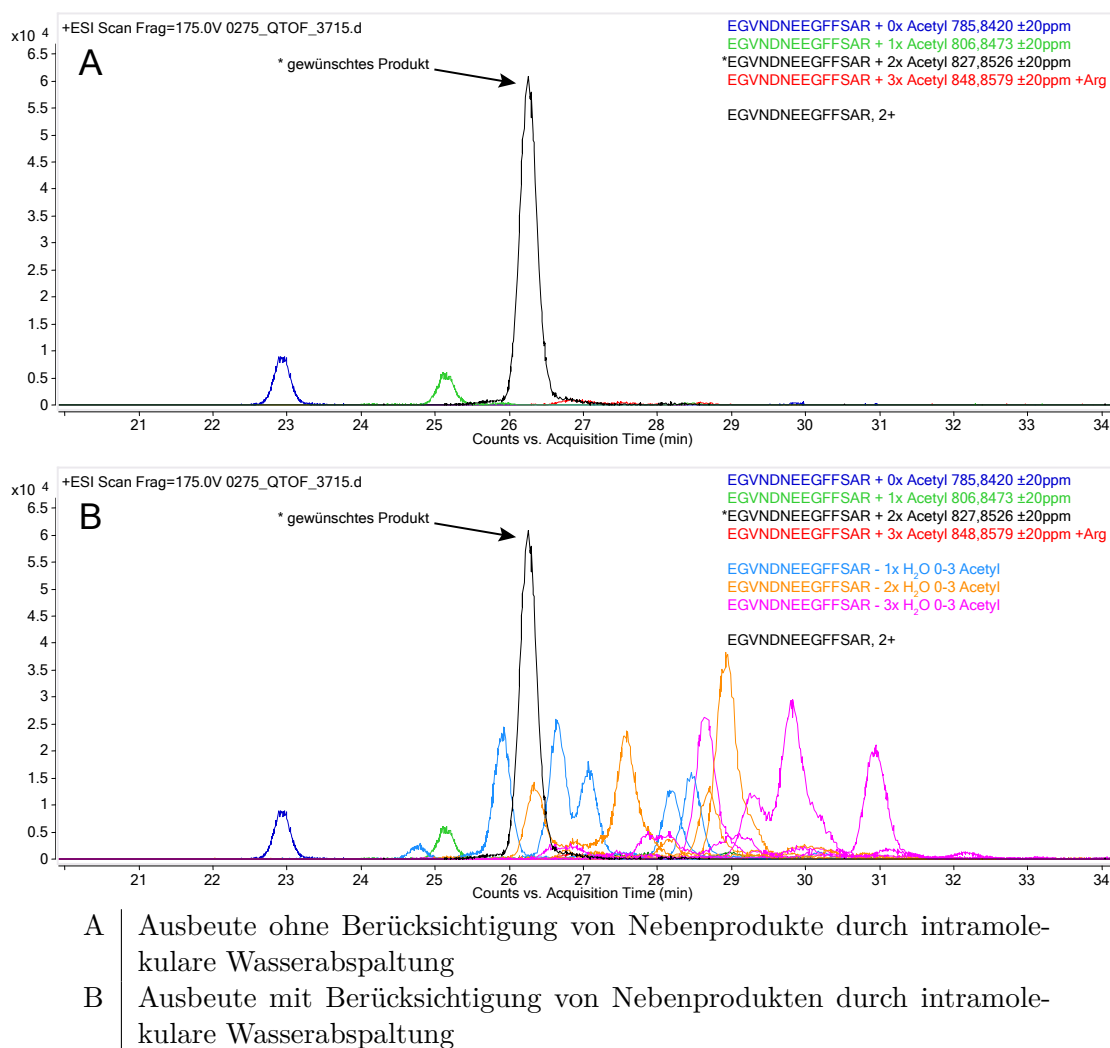


**Abbildung 8.10** – Veresterungsprodukte des Peptids SNTHPpSPDDAFR mit Acetanhydrid in THF mit Bismuthtriflat, Edukte mit 3 Å Molekularsieb getrocknet; unterstrichene Aminosäuren können dabei verestert sein, die Reaktion am Arginin ist aufgrund des Basizitätsverlustes unerwünscht. Das N-terminale Serin kann auch am N-Terminus unter Amidbildung reagieren (zweiter Unterstrich); die Auftrennung der Peaks am gewünschten Produkt deutet darauf hin, dass die Reaktion bis zum vierfach succinyliertem Produkt über unterschiedliche Zwischenschritte verläuft.

Die Veresterung wurde an den Aqua-Peptiden SNTHPpSPDDAFR und RApSPPLF-QSR optimiert. Dazu wurden 10 pmol des Aqua-Peptides mit 4 µl Essigsäure, 26 µl Acetanhydrid und 20 µl Tetrahydrofuran versetzt, welches 10 pmol Bismuthtriflat enthielt. Die Reaktion fand bei 35 °C über drei Tage lang statt, wobei jeweils nach einem Tag das Anhydrid und das Tetrahydrofuran ergänzt wurden. Wie in Abbildung 8.9 auf Seite 113 zu sehen ist, war die Ausbeute an gewünschtem Produkt nicht ausreichend. Außerdem trat wiederum eine Amidierung an der Seitengruppe des Arginins auf.

Es wurde versucht, die Ausbeute an gewünschtem Produkt zu erhöhen, indem möglicherweise vorhandenes Wasser aus den verwendeten Lösungsmitteln mit Hilfe eines Molekularsiebes mit einer Porenweite von 3 Ångström (Å) entfernt wurde. Es ergab sich jedoch bei einem Ansatz mit 1 µl Essigsäure, 26 µl Acetanhydrid und 20 µl Tetrahydrofuran, welches 10 pmol Bismuthtriflat enthielt, keine sichtbare Steigerung der Ausbeute. Die Reaktion, deren Ergebnis in Abbildung 8.10 auf Seite 114 dargestellt ist, wurde bei 35 °C über Nacht durchgeführt. Auch eine direkte Zugabe von Molekularsieben zum Reaktionsansatz brachte keine Steigerung der Reaktionsausbeute.

Am Peptid Glu-Fib wirkt die Ausbeute an gewünschtem Produkt auf den ersten Blick zwar hoch, siehe Teil A von Abbildung 8.11 auf Seite 115, bei genauerer Analyse lassen sich jedoch etliche Nebenprodukte ausmachen, die durch intramolekulare Wasserabspaltung an der Glutaminsäure und Asparaginsäure zustande kommen, siehe Teil B von Abbildung 8.11 auf Seite 115. Diese Nebenprodukte der Reaktion führen zu einer unerwünschten Erhöhung der Komplexität im Chromatogramm. Somit musste auch dieser Reaktionsansatz verworfen werden. Die Carboxyseitenketten der beiden Aminosäuren hätten vermutlich durch einen zusätzlichen Veresterungsschritt in methanolischer Salzsäure vor der Wasserabspaltung geschützt werden können. Dies hätte die Methode jedoch zusätzlich verkompliziert und einen weiteren Reaktionsschritt mit variabler Ausbeute hinzugefügt.



- A | Ausbeute ohne Berücksichtigung von Nebenprodukten durch intramolekulare Wasserabspaltung
- B | Ausbeute mit Berücksichtigung von Nebenprodukten durch intramolekulare Wasserabspaltung

**Abbildung 8.11** – Nebenprodukte der Veresterung von Glu-Fib EGVNDNEEGFFSAR mit Bi(OTf)<sub>3</sub> und Acetanhydrid; Die Ausbeute an gewünschtem Produkt in den Extracted-Ion-Chromatogrammen scheint relativ hoch (A), es treten jedoch sehr viele Nebenprodukte durch intramolekulare Wasserabspaltung auf (B), welche das Ergebnis relativieren.

### 8.3.9 Veresterungsversuche am Protein

Es wurde versucht, die Veresterung insbesondere die säurekatalysierte Veresterung mit Bernsteinsäureanhydrid und Trifluoressigsäure in Abschnitt 8.3.4 am Protein PKA zu reproduzieren. Die ersten Versuche zielten auf eine Veresterung im Gel ab, da dort durchzuführende Wasch- und Aufreinigungsschritte leichter zu realisieren waren. Die PKA-Gelbanden wurden wie in Abschnitt 8.3.1 beschrieben guanidiert, gewaschen und getrocknet. Anschließend erfolgte die Veresterung im wasserfreien Milieu mit THF als

Lösungsmittel und Propionsäureanhydrid oder Bernsteinsäureanhydrid als Säurekomponente. Die Ausbeute der Reaktion war jedoch bei allen Ansätzen wesentlich schlechter als am Peptid. Zudem ergaben sich Probleme, die daraus resultierten, dass das Gel im wasserfreien Milieu nicht quoll. Das so war bei den Versuchen das Propionsäureanhydrid mit 9 Waschschritten zu je 30 min nicht aus dem Gel zu entfernen. Dies wiederum resultierte unter anderem in einer Verschlechterung des tryptischen Verdaus des Proteins. Für eine erfolgreiche Durchführung der geplanten Modifikationsstrategie hätte das gesamte leichte Anhydrid des ersten Schritts für das Verestern mit schwerem Acetanhydrid im dritten Schritt entfernt werden müssen. Die Experimente zur Veresterung von PKA in Lösung waren ebenfalls nicht erfolgreich, da nach der Reaktion keine Proteinbanden auf dem SDS-Gel zu erkennen waren. Die Versuche zeigten somit, dass die vorgesehene Modifikationsstrategie nicht in die Praxis umsetzbar ist und wurden daher nicht weitergeführt.

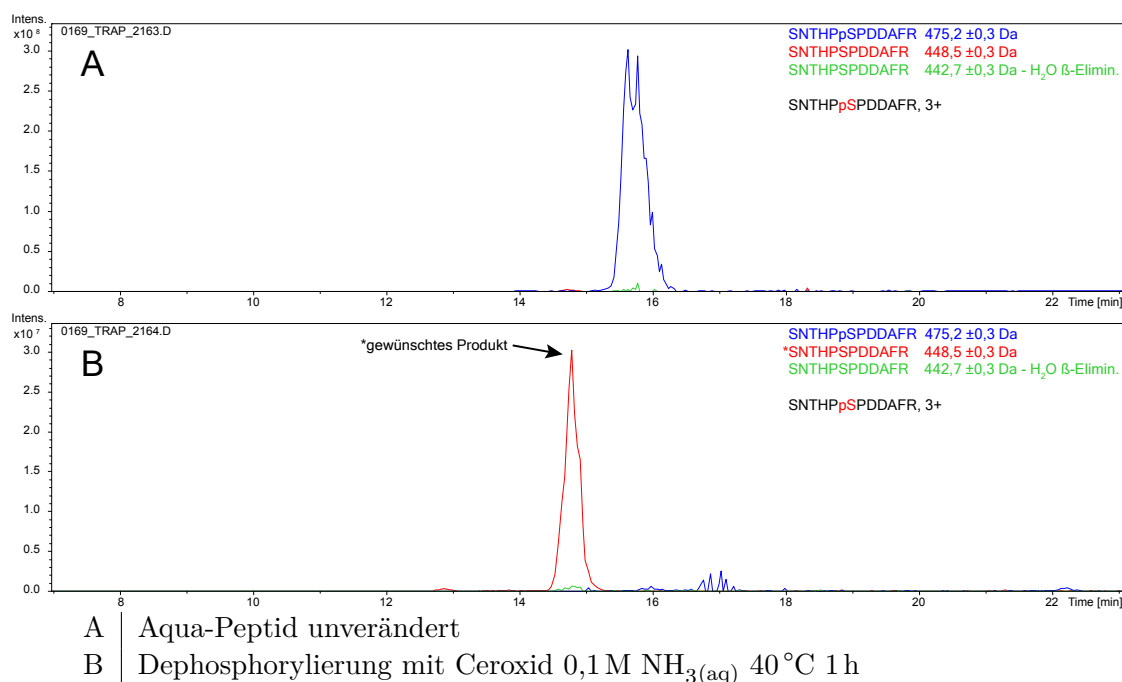
### 8.3.10 Dephosphorylierung mit Lanthanoidverbindungen

Während der Versuche zu den chemischen Modifikationen wurden außerdem Möglichkeiten zur chemischen Dephosphorylierung von Proteinen untersucht. Für die chemische Dephosphorylierung von Phospholipiden (Shaw und Stead, 1974), Phosphopeptiden (Kuyama et al., 2003) und Phosphoproteinen (Woo et al., 2008) kann Flusssäure verwendet werden. Diese spaltet die Phosphoesterbindung sehr schnell und spezifisch. Da Flusssäure sehr toxisch ist und der Umgang mit ihr daher vergleichsweise aufwendig, wurden in den letzten Jahren Alternativen für die chemische Dephosphorylierung gesucht.

Dabei zeigten vor allem Cerverbindungen hydrolytische Wirkung auf nicht aktivierte Phosphomonoester. Tan et al. (2008) zeigten eine Methode zur Dephosphorylierung von Phosphopeptiden mittels Ceroxid unter basischen Bedingungen bei Raumtemperatur. Kuchma et al. (2010) hingegen zeigten die Dephosphorylierung von para-Nitrophenylphosphat, O-Phospho-L-Tyrosin und Adenosintriphosphat mit Cer(III)- und Cer(IV)-Nanopartikeln unter neutralen bis sauren Bedingungen.

Neben den unlöslichen Ceroxiden besitzen auch lösliche Lanthanoid-Komplexe eine Aktivität bei der Hydrolyse von Phosphoestern. So zeigten unter anderem Komplexe von Cer und Lanthan mit Tris, Bis-Tris und Bis-Tris-Propan Aktivität bei der Hydrolyse von Phosphodiestern (Gómez-Tagle und Yatsimirsky, 2001; Medrano et al., 2003; Maldonado und Yatsimirsky, 2005)

Es wurde versucht, ausgehend von den von Tan et al. (2008) verwendeten Bedingungen, Ceroxid zur Dephosphorylierung von PKA vor dem Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel zu verwenden. Dazu wurden 20 pmol PKA mit 40 µl 0,1 M  $\text{NH}_3(\text{aq})$  bzw. 1 M NaOH versetzt und eine Spatelspitze Ceroxid hinzugegeben. Der Ansatz wurde anschließend einmal bei 40 °C für eine Stunde und einmal bei 70 °C für 45 Minuten erhitzt. Das Ceroxid wurde abzentrifugiert und der Überstand auf das Polyacrylamidgel gegeben. Nach dem In-Gel-Verdau über Nacht erfolgte die Analyse auf dem Q-TOF. Während ein Versuch mit dem Aqua-Peptid SNTHPpSPDDAFR mit 40 µl 0,1 M  $\text{NH}_3(\text{aq})$  und Ceroxid bei 40 °C und 1 h Reaktionszeit zu einer quantitativen Dephosphorylierung des Peptids führte, siehe Abbildung 8.12 auf Seite 117, war am Protein keine Dephosphorylierung zu



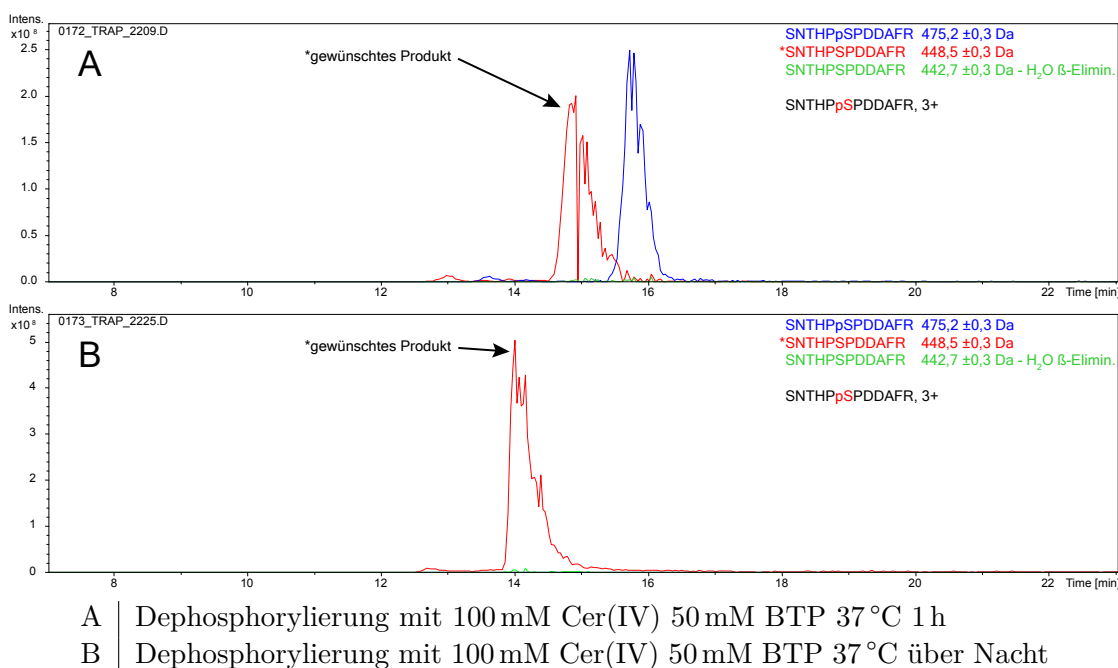
**Abbildung 8.12** – Dephosphorylierung von SNTHPpSPDDAFR mit Ceroxid unter alkalischen Bedingungen in 0,1 M NH<sub>3(aq)</sub>; nach einer Stunde ist eine fast vollständige Dephosphorylierung des Phosphopeptids zu beobachten.

beobachten. Ein Grund dafür könnte die im Vergleich zum Peptid komplexere Struktur des Proteins sein, welche eine Interaktion eines Ceroxidpartikels mit der entsprechenden Phosphorylierungsstelle erschwert.

Es wurde daher ein Reaktionsansatz gewählt, bei dem das Cer in Lösung vorliegt. So zeigten Luedtke und Schepartz (2005), dass die Lanthanoid-Komplexe, welche bei der Phosphodiester-spaltung aktiv waren (Gómez-Tagle und Yatsimirsky, 2001), auch bei der Dephosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin verwendet werden können. Unter den Lanthanoiden zeigte dabei Cer(IV) bei der Verwendung von Bis-Tris-Propan (BTP) als Komplexbildner die höchste Aktivität. Des Weiteren war eine zusätzliche Aktivitätssteigerung vorhanden, wenn das Cer(IV)-Ammonium-Nitrat (CAN), welches bei den Versuchen verwendet wurde, über einen längeren Zeitraum (>100 d) in Wasser gelöst vorlag oder die frisch angesetzte Lösung für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt wurde. Die Autoren vermuten, dass unter diesen Bedingungen ein besonders aktiver Cerhydroxid-Komplex gebildet wird.

Als Versuchspeptid für die Cer(IV)-katalysierte Dephosphorylierung wurde das phosphorylierte Aqua-Peptid SNTHPpSPDDAFR verwendet. Dazu wurde Cer(IV)-Ammonium-Nitrat in einer Konzentration von 100 mM in Wasser gelöst und für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt. Danach wurde 1  $\mu$ l dieser Lösung zu 99  $\mu$ l einer 50 mM Bis-Tris-Propan-Lösung in Wasser gegeben. Von dieser Mischung wurden 20  $\mu$ l auf 10 pmol des getrockneten Peptids gegeben. Der Ansatz wurde im Anschluss bei jeweils 37 °C für 1 Stunde und

## 8 Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen durch chemisches Labeling



**Abbildung 8.13** – Dephosphorylierung von SNTHPpSPDDAFR mit 100 mM Cer(IV) und 50 mM Bis-Tris-Propan; bei einer Reaktionsdauer von 1 h bei 37 °C ist eine deutliche Dephosphorylierung zu erkennen (A), bei einer Reaktion bei 37 °C über Nacht ist die Dephosphorylierung vollständig (B).

über Nacht inkubiert und danach auf der Ionenfalle gemessen. Wie in Abbildung 8.13 auf Seite 118 zu sehen ist, ist nach einer Stunde eine deutliche Dephosphorylierung zu erkennen. Über Nacht ist die Dephosphorylierung vollständig. Als Nebenreaktion ist ein sehr geringer Anteil an  $\beta$ -Eliminierung am Phosphoserin zu erkennen. Die beobachtete Retentionszeitverschiebung der beiden Messungen in Abbildung 8.13 hängt möglicherweise mit der relativ hohen Konzentration von Bis-Tris-Propan zusammen, mit welcher die Probe injiziert wurde.

Die Verwendung von Cer(IV)-Ammonium-Nitrat führte in einem Fall zu Problemen bei der LC-MS-Analyse, da vermutlich Cer(IV)-Ammonium-Nitrat im Bereich von Autosampler und Vorsäule ausgefallen war, welches sich nur langsam im wässrigen Milieu aus dem System eluieren ließ. Das Cer(IV)-Ammonium-Nitrat konnte in diesem Fall nur nach seiner Reduktion durch Ascorbinsäure aus dem System entfernt werden.

Im Anschluss an die erfolgreiche Dephosphorylierung des Aqua-Peptids wurde der gleiche Ansatz mit 20 pmol PKA durchgeführt. Dabei wurde PKA zu 20  $\mu$ l der oben beschriebenen Lösung von Cer(IV)-Ammonium-Nitrat in Bis-Tris-Propan gegeben, bei einem weiteren Ansatz wurde zu diesem noch zusätzlich 1  $\mu$ l 5 % SDS-Lösung zur Denaturierung hinzugefügt. Die Ansätze wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben im Vakuum getrocknet und in 10  $\mu$ l LDS-Puffer aufgenommen. Nach Reduktion und Alkylierung wurde die Probe über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt und



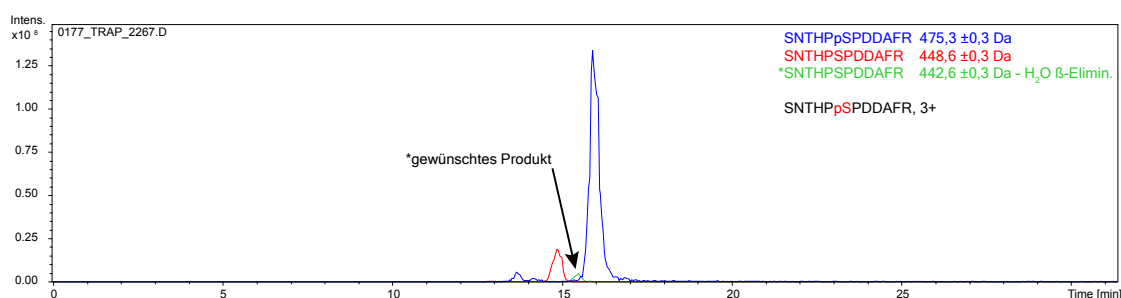
dann mit Trypsin verdaut. Wie auch schon bei den Dephosphorylierungsversuchen am Protein mit Ceroxid war keine Dephosphorylierung zu erkennen.

### 8.3.11 $\beta$ -Eliminierung mit Lanthanoidverbindungen

In ihren Untersuchungen zur Dephosphorylierung mit Cer(IV)-Komplexen zeigten Luedtke und Schepartz (2005), dass bei der Verwendung von Lanthan(III)-BTP-Komplexen anstelle der Dephosphorylierung an Phosphoserinen und Phosphothreoninen eine  $\beta$ -Eliminierung der Phosphatgruppe die überwiegende Reaktion ist. Dies stellt eine milde Alternative zur  $\beta$ -Eliminierung unter harscheren Bedingungen (40 mM BaOH, 50 °C pH > 12) (Byford, 1991) dar.

Die Idee war daher, zu testen, ob eine vollständige  $\beta$ -Eliminierung Vorteile für die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades bringen kann. So wäre zu vermuten, dass die Unterschiede im Verhältnis der Ionisierungseffizienzen von  $\beta$ -eliminierten zu unphosphorylierten Peptid geringer sind als die von phosphorylierten zu unphosphorylierten Peptid. Des weiteren sollte die Beeinflussung der Proteaseaktivität beim  $\beta$ -eliminierten Peptid geringer sein als beim Phosphopeptid. Diese Methode wäre zwar nur bei an Serin und Threonin phosphorylierten Peptiden nutzbar, durch das häufige Auftreten der Serin- und Threoninphosphorylierung würde sie dennoch Vorteile bei der Analyse bieten.

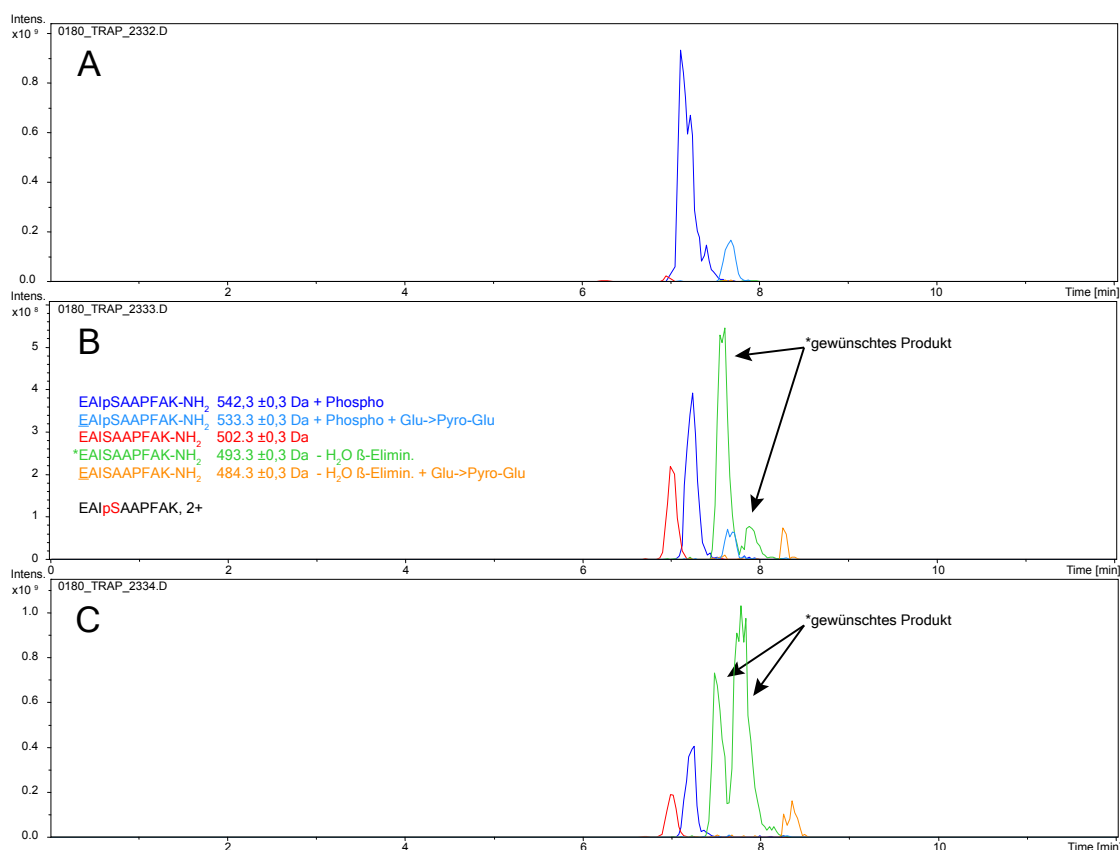
Für die ersten Versuche zur  $\beta$ -Eliminierung der Phosphatgruppe an Phosphopeptiden wurden je 10 pmol Aqua-Peptid SNTHPpSPDDAFR mit 20  $\mu$ l einer wässrigen Lösung von 50 mM Bis-Tris-Propan und jeweils 2 mM Lösungen dreiwertiger Lanthanoidverbindungen von Lanthan (La(III)), Lutetium (Lu(III)) und Cer (Ce(III)) versetzt. Die Reaktion wurde bei 35 °C über Nacht durchgeführt. Die beste Ausbeute an  $\beta$ -Eliminationsprodukt ergab sich bei der Verwendung von La(III), jedoch war diese dort ebenfalls relativ niedrig, siehe Abbildung 8.14 auf Seite 119. Es wurde daher versucht, die Ausbeute an  $\beta$ -Eliminierungsprodukt an verschiedenen Phosphopeptiden zu erhöhen. Am Beispiel des Peptids EAIpSAAPFAK-NH<sub>2</sub> wurde die pH-Abhängigkeit der  $\beta$ -Eliminierungsreaktion untersucht.



**Abbildung 8.14** –  $\beta$ -Eliminierung von SNTHPpSPDDAFR mit La(III) und Bis-Tris-Propan bei 35 °C über Nacht; die Ausbeute an  $\beta$ -Eliminierungsprodukt ist relativ niedrig.

Dazu wurden je 10 pmol des Peptids mit 20  $\mu$ l einer wässrigen Lösung von 50 mM Tris beziehungsweise Bis-Tris-Propan und jeweils 10 mM der Lanthanoide La(III) und Lu(III)

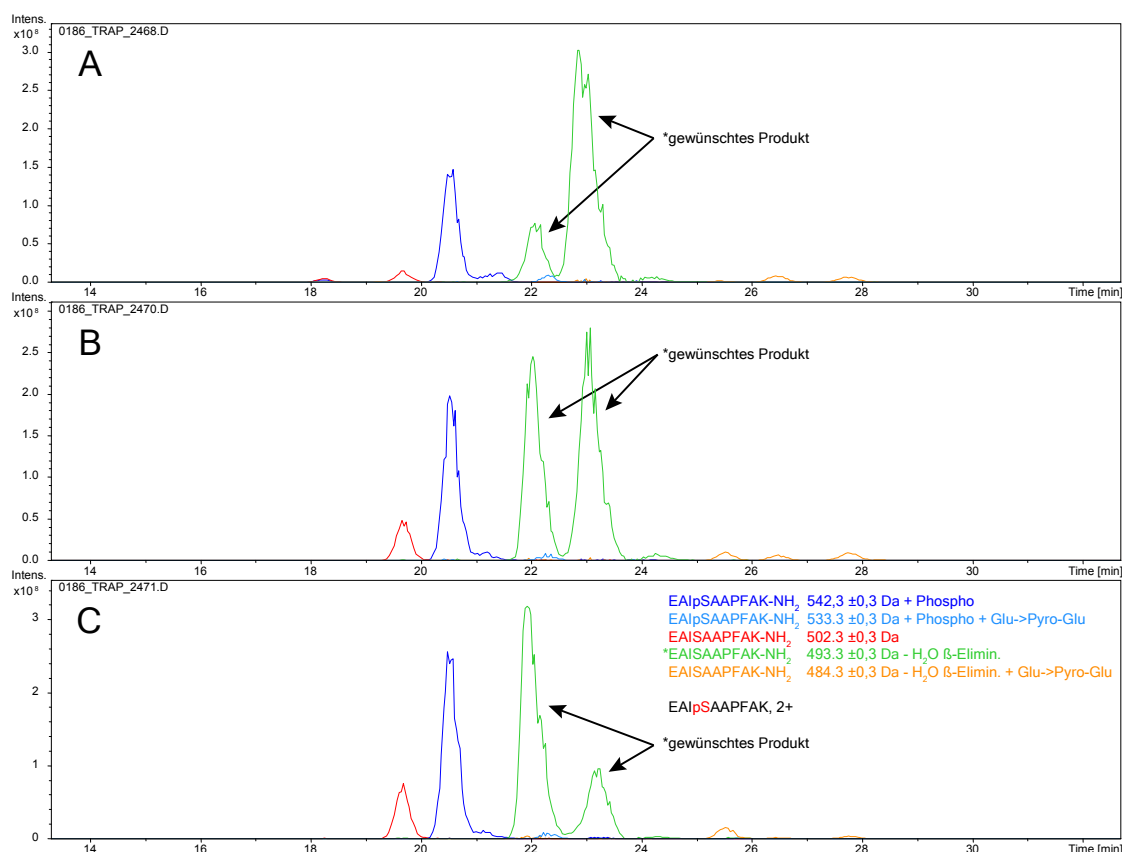
## 8 Quantifizierung von Phosphorylierungsstellen durch chemisches Labeling



- |   |                                                         |
|---|---------------------------------------------------------|
| A | β-Eliminierung mit La(III) BTP pH 3,5 37 °C über Nacht  |
| B | β-Eliminierung mit La(III) BTP pH 8,0 37 °C über Nacht  |
| C | β-Eliminierung mit La(III) BTP pH 10,0 37 °C über Nacht |

**Abbildung 8.15** – β-Eliminierung von EAIpSAAPFAK-NH<sub>2</sub> mit La(III) und Bis-Tris-Propan bei verschiedenen pH-Werten; bei einer Erhöhung des pH-Wertes ist eine deutliche Steigung an β-Eliminierungsprodukt zu erkennen, welches als cis-trans-Isomere vorliegt. Das Gleichgewicht der Reaktion liegt allerdings nicht vollständig auf der Seite der Produkte und es findet parallel eine Dephosphorylierung als Konkurrenzreaktion statt.

versetzt. Die Reaktion wurde bei 35 °C über Nacht durchgeführt. In Abbildung 8.15 auf Seite 120 sind die Ergebnisse der Versuche mit La(III) und Bis-Tris-Propan dargestellt, welche die beste Ausbeute ergaben. Es ist zu erkennen, dass sich mit steigendem pH-Wert eine höhere Ausbeute an β-Eliminierungsprodukt ergibt. Beim Eliminierungsprodukt ist außerdem eine Aufspaltung des Peaks zu erkennen, was vermutlich an einer cis-trans-Isomerie des Produkts liegt. Veränderte harschere Reaktionsbedingungen bei höheren Temperaturen von 70 °C ergaben eine vollständige Umsetzung des Phosphopeptids. Jedoch war neben der Eliminierungsreaktion auch immer eine gewisse Menge des



- |   |                                                             |
|---|-------------------------------------------------------------|
| A | β-Eliminierung mit La(III) Arginin pH 12,5 40 °C über Nacht |
| B | β-Eliminierung mit La(III) BTP pH 10,5 40 °C über Nacht     |
| C | β-Eliminierung mit La(III) Tris pH 10,5 40 °C über Nacht    |

**Abbildung 8.16** – β-Eliminierung von EAIPSAAPFAK-NH<sub>2</sub> mit La(III) Arginin, Bis-Tris-Propan und Tris; bei der Verwendung verschiedener Komplexbildner fallen die Verhältnisse der Isomere des β-Eliminierungsprodukts unterschiedlich aus, das Gleichgewicht der Reaktion liegt nicht vollständig auf der Seite der Produkte.

Dephosphorylierungsprodukts zu erkennen, welches alternativ auch durch eine Addition von Wasser an das β-Eliminierungsprodukt entstanden sein könnte. Weiterhin wurde untersucht, ob die Zugabe von Lösungsmitteln wie Methanol, Acetonitril, Tetrahydrofuran und Pyridin die Ausbeute an Eliminierungsprodukt positiv beeinflussen kann. Es waren bei den Experimenten mit einer 1:1-Mischung von Wasser und dem jeweiligen Lösungsmittel jedoch keine Änderungen in der Produktausbeute zu erkennen.

Durch Medrano et al. (2003) wurde von einer starken hydrolytischen Aktivität von Lanthan(III)-Komplexen mit Glycin-Derivaten berichtet. Davon ausgehend wurde der Einfluss von Glycin, N,N-Dimethylglycin, Kreatin, Arginin, L-Methionin, L-Cystein, 2,4-

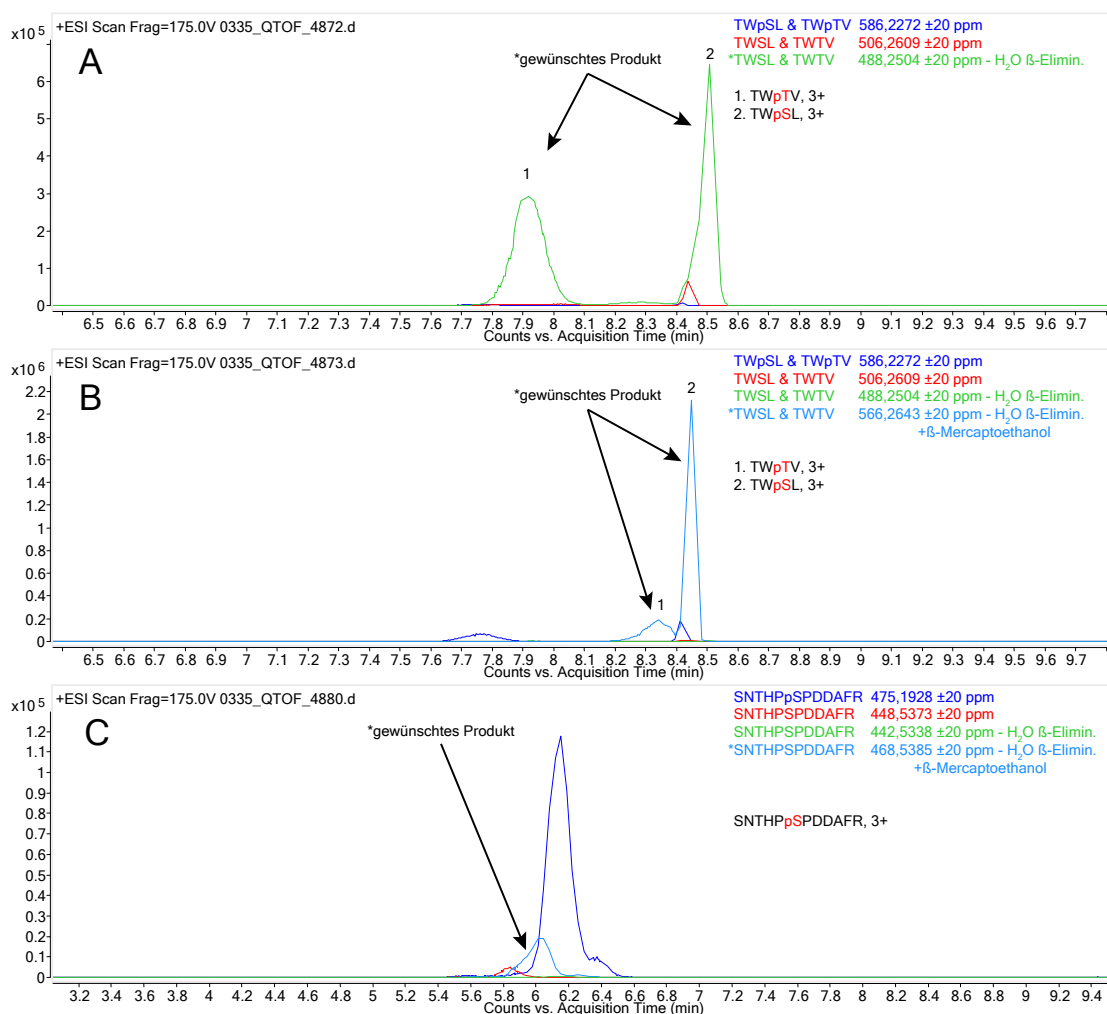
Diaminbernsteinsäure, DL-Ornithin, DL-Lysin und Pyridoxal auf die  $\beta$ -Eliminierung untersucht. Bei der Verwendung von Lanthan(III) in Kombination mit Arginin, Glycin, L-Methionin, 2,4-Diaminbernsteinsäure, DL-Ornithin und DL-Lysin war bei pH-Werten im Bereich von 8,5–10,5 eine  $\beta$ -Eliminierung bei einer Reaktion bei 40 °C über Nacht zu beobachten, wenngleich die Ausbeute an Eliminierungsprodukt nicht so hoch ausfiel wie bei der Verwendung von Bis-Tris-Propan. Bei der Verwendung von Arginin und Bis-Tris-Propan als Komplexbildner für Lanthan(III) war eine Veränderung des Verhältnisses der beiden Isomere des  $\beta$ -Eliminierungsproduktes zu beobachten, es traten jedoch weiterhin beide Isomere auf, siehe Abbildung 8.16 auf Seite 121. Erkennbare Einflüsse auf die Ausbeute waren nicht zu beobachten.

In den nächsten Experimenten wurde die  $\beta$ -Eliminierung an den Peptiden TWpSL und TWpTV weiter untersucht und optimiert. Die kurzen Peptide wurden wegen der geringeren Wahrscheinlichkeit von Nebenreaktionen und sterischer Beeinflussung gewählt. Reaktionsbedingungen mit 2  $\mu$ l 100 mM La(III) und 18  $\mu$ l 50 mM Bis-Tris-Propan mit 10 % Triethylamin (TEA) zeigten eine gute Ausbeute an Eliminierungsprodukt bei den Peptiden TWpSL und TWpTV, siehe Teil A von Abbildung 8.17 auf Seite 123. Da die beiden Peptide isobar sind, ergeben sich dort im Extracted-Ion-Chromatogramm zwei Peaks mit unterschiedlicher Retentionszeit. An das  $\beta$ -Eliminierungsprodukt kann direkt nach der Eliminierung ein Thiol oder Amin mit einer Michael-Addition hinzugefügt werden (Meyer et al., 1986). Dieses Verfahren machen sich auch die beiden phosphorylierungsspezifischen Quantifizierungsmethoden PhIAT und PhIST, siehe Abschnitt 1.4.6 der Einleitung, zunutze.

Auch diese Reaktion, welche im Anschluss an die  $\beta$ -Eliminierung mit  $\beta$ -Mercaptothiol durchgeführt wurde, ergab eine gute Ausbeute bei den Peptiden TWpSL und TWpTV, siehe Teil B der Abbildung 8.17 auf Seite 123. Beim Aqua-Peptid SNTHPpSPDDARF hingegen war die Ausbeute an Additionsprodukt gering, siehe Teil C der Abbildung 8.17. Dies lässt sich durch das Prolin N-terminal des Phosphoserines erklären. Dieses behindert vermutlich die  $\beta$ -Eliminierung, wie auch die Experimente von Luedtke und Schepartz (2005) zeigten.

Im Anschluss an die Experimente an den Peptiden wurde das Protein PKA den gleichen Reaktionsbedingungen ausgesetzt. Dort war je nach Phosphorylierungsstelle keine oder nur eine teilweise  $\beta$ -Eliminierung mit anschließender Addition von  $\beta$ -Mercaptoethanol zu beobachten. Daher wurde auch dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassend birgt die  $\beta$ -Eliminierung der Phosphorylierung mehrere Probleme. Die Reaktion konnte nicht vollständig durchgeführt werden. Zudem scheint als Nebenreaktion eine Dephosphorylierung stattzufinden. Eine Addition von Wasser an die reaktive Dihydroverbindung konnte mit Hilfe von  $^{18}\text{O}$ -Wasser ausgeschlossen werden. Bei einer Michael-Addition an das Eliminierungsprodukt entstehen zudem Diastereomere, welche die Analytik für die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades erschweren würden.



- A |  $\beta$ -Eliminierung von TWpSL & TWpTV mit La(III) BTP, TEA pH 12  
60 °C 90 min
- B |  $\beta$ -Eliminierung von TWpSL & TWpTV mit La(III) BTP, TEA pH 12  
60 °C 90 min, Addition von  $\beta$ -Mercaptoethanol
- C |  $\beta$ -Eliminierung von SNTHPpSPDDAFR mit La(III) BTP, TEA  
pH 12 60 °C 90 min, Addition von  $\beta$ -Mercaptoethanol

**Abbildung 8.17** –  $\beta$ -Eliminierung von TWpSL, TWpTV und SNTHPpSPDDAFR mit La(III), Bis-Tris-Propan und Triethylamin (TEA) und anschließend der Addition von  $\beta$ -Mercaptoethanol. Während die  $\beta$ -Eliminierung von TWpSL und TWpTV eine gute Ausbeute liefert, ist die Reaktion beim Peptid SNTHPpSPDDAFR nur unvollständig, was vermutlich auf das Prolin n-terminal vom Phosphoserin zurückzuführen ist. Dieses behindert vermutlich die  $\beta$ -Eliminierung (Luedtke und Schepartz, 2005).

## 8.4 Diskussion

Obwohl es in Ansätzen gelang, Serin und Threonin durch Veresterung zu modifizieren, war die Ausbeute für einen quantitativen Ansatz zu gering. Retrospektiv gesehen könnte die Aktivierung der Carbonsäure durch *N,N'*-Carbonyl-di-imidazol bei höheren Reaktionstemperaturen noch eine bessere Ausbeute liefern, allerdings ist auch hier fraglich, ob eine quantitative Veresterung der Hydroxygruppen erfolgreich wäre. Prinzipiell könnte zudem eine mögliche Umesterung beim zweiten Veresterungsschritt den Erfolg der Methode selbst bei vollständiger Veresterung beeinträchtigen. Wenn es gelänge, die Ausbeuten der Veresterungsschritte am Protein zu erhöhen und wenn eine Umesterung nicht stattfände, würde der Ansatz jedoch etliche Probleme bei der Quantifizierung der Proteinphosphorylierung lösen.

Bei den Versuchen zur  $\beta$ -Eliminierung am Phosphoserin konnte ebenfalls keine vollständige Reaktionsausbeute erreicht werden, welche für die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades notwendig wäre. Bei den Versuchen wurde jedoch bei der Reaktion mit Cer(IV)-Ammonium-Nitrat in  $^{18}\text{O}$ -Wasser ein Austausch von  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffatomen an den Carboxyfunktionen am C-Terminus und an den Seitenketten von Glutamin- und Asparaginsäure beobachtet. Dies führte zur Entwicklung einer Methode zum relativen Quantifizieren von Peptiden mittels säurekatalysiertem  $^{18}\text{O}$ -Labeling. Die Experimente zu dieser Methode sind in Kapitel 10 ab Seite 141 beschrieben.

## 9 Relative Quantifizierung der mPER2-Phosphorylierung mittels $^{15}\text{N}$ -Labeling

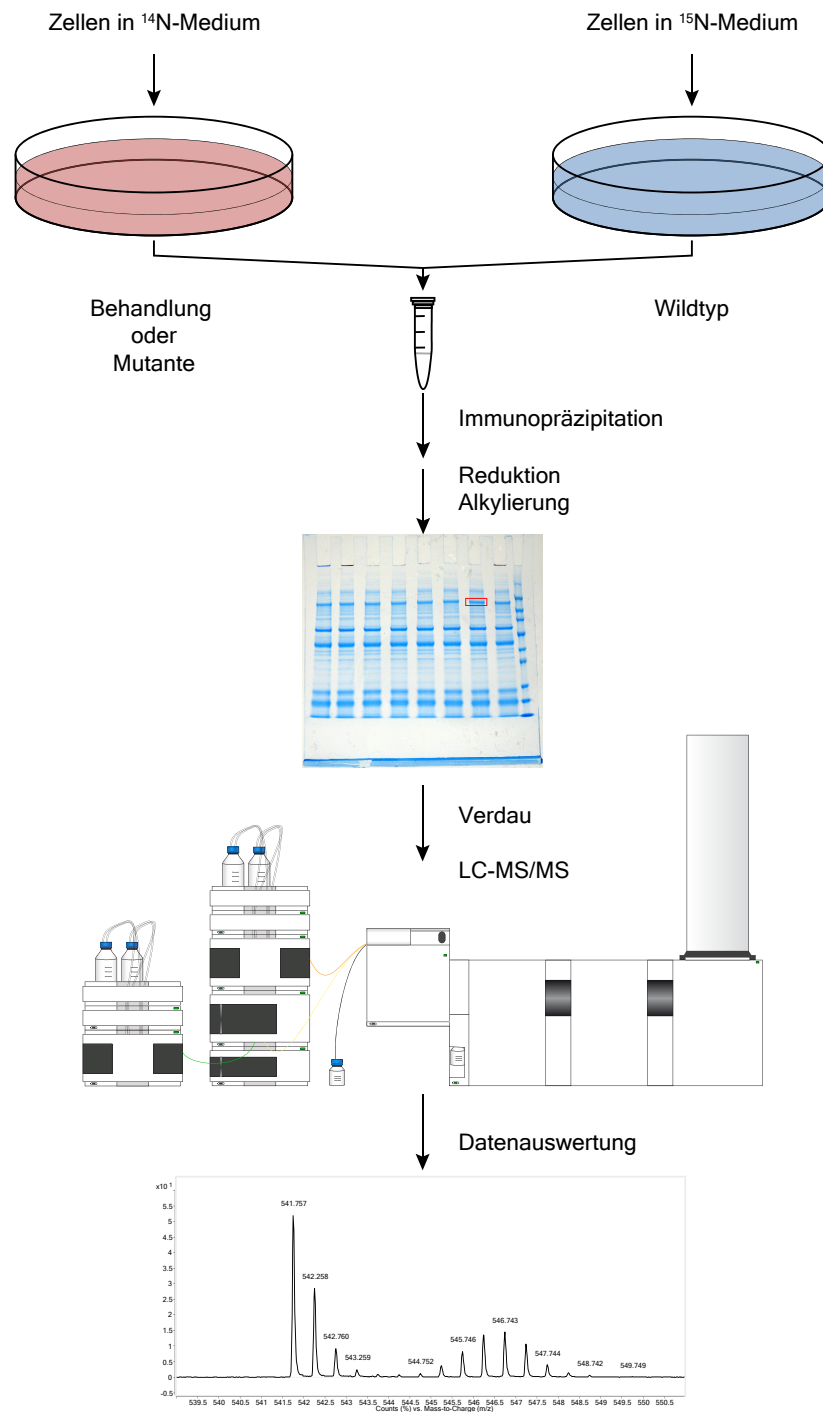
### 9.1 Einleitung

Wie in Abschnitt 1.4.4 der Einleitung beschrieben ist, wird für das relative Quantifizieren von Proteinen mittels LC-MS  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff zum metabolischen Labeling mit stabilen Isotopen eingesetzt. Die Verwendbarkeit von  $^{15}\text{N}$ -Labeling bei proteomischer Analytik mit Massenspektrometrie wurde zuerst von Oda et al. (1999) gezeigt. Da Pflanzen aufgrund ihrer Autotrophie alle Aminosäuren selbst synthetisieren können, wird bei diesen das  $^{15}\text{N}$ -Labeling meist durch den Einsatz eines  $^{15}\text{N}$ -Stickstoffsalzes durchgeführt. Mit dieser Methode lassen sich die Pflanzen relativ kostengünstig mit einem hohen Markierungsgrad labeln. Bei tierischen Zellen hingegen wird die Isotopenmarkierung durch die Zugabe von  $^{15}\text{N}$ -stickstoffhaltigen Zuckern oder Aminosäuren erreicht, was jedoch aufwendiger als die Vorgehensweise bei den Pflanzen ist und meist zu einem schlechteren Markierungsgrad führt.

Mittlerweile wurden auch komplette Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* (Nelson et al., 2007) oder auch ganze Tiere wie *Caenorhabditis elegans* (Krijgsveld et al., 2003), *Drosophila melanogaster* (Krijgsveld et al., 2003) oder *Rattus norvegicus* (McClatchy et al., 2007) und *Mus musculus* (Frank et al., 2009) für proteomweite Analysen mittels Massenspektrometrie mit  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff markiert. Das  $^{15}\text{N}$ -Labeling bietet sich im Fall der Period-Proteine als Methode zum metabolischen Labeling an, da deren Sequenz beim proteolytischen Verdau zu vielen Peptiden und Phosphopeptiden führt, welche kein Arginin oder Lysin enthalten. Daher können diese mit einem SILAC-Ansatz nicht erfasst werden. Da das  $^{15}\text{N}$ -Labeling alle Aminosäuren einschließt, ist bei diesem Ansatz die Quantifizierung von allen Peptiden möglich. Somit lässt sich auch der Ansatz eines Multiproteaseverdau, wie er für die qualitative Analyse der Phosphorylierung in dieser Arbeit verwendet wurde, bei der relativen Quantifizierung mit  $^{15}\text{N}$ -Labeling anwenden. Der prinzipielle Ablauf der  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung ist in Abbildung 9.1 auf Seite 126 gezeigt.

In dem vorliegenden Experiment sollte die Phosphorylierung des überexprimierten mPER2 in HEK293-Zellen im Vergleich zu HEK293-Zellen untersucht werden, bei denen zusätzlich noch die humane *Serine/threonine-protein phosphatase 2A* (PP2A) in der *55 kDa regulatory subunit B beta Isoform* (PPP2R2B) überexprimiert war, welche vermutlich bei der Regulation des circadianen Systems eine Rolle spielt, vgl. Abschnitt 1.6 in der Einleitung. Ziel war es dabei, Phosphorylierungsstellen an mPER2 zu identifizie-

## 9 Relative Quantifizierung der mPER2-Phosphorylierung mittels $^{15}\text{N}$ -Labeling



**Abbildung 9.1** – Arbeitsablauf für das Labeling von Proteinen mit  $^{15}\text{N}$ -Isotopen; die Isotopenmarkierung der Proteine der Vergleichsprobe erfolgt *in vivo*, nach der Zellernte werden die Proben zusammengeführt und sämtliche Arbeitsschritte gemeinsam durchgeführt.



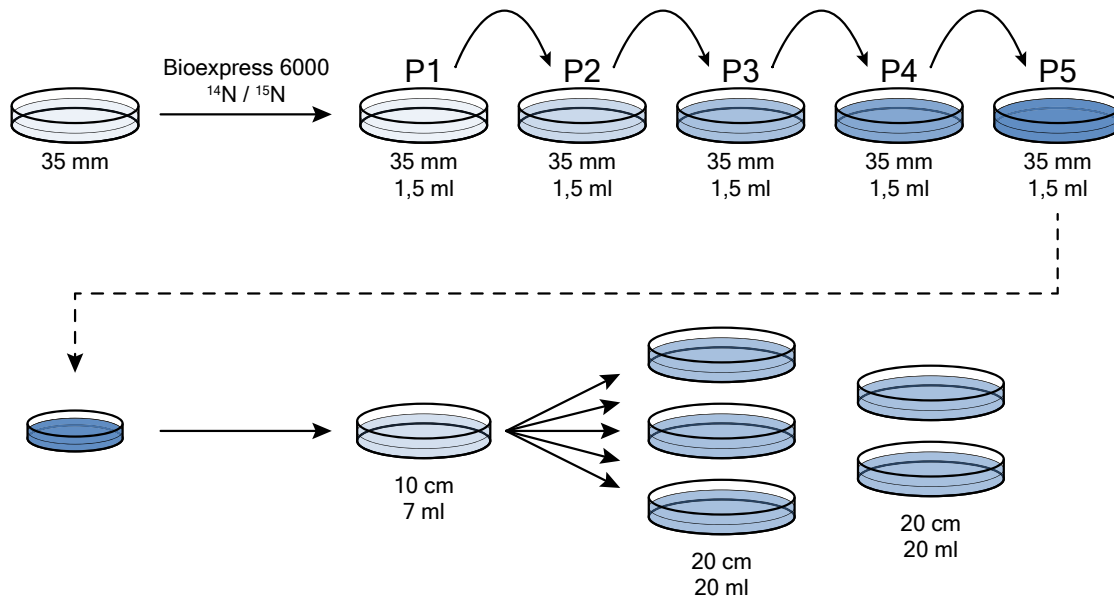
ren, welche durch PP2A *in vivo* dephosphoryliert werden. Diese würden im Experiment durch ein abweichendes Verhältnis der leichten und schweren Variante des entsprechenden Phosphopeptids zu erkennen sein.

## 9.2 Material und Methoden

### 9.2.1 $^{15}\text{N}$ -Labeling der Zellen

Das  $^{15}\text{N}$ -Labeling der mPER-Proteine aus HEK293-Zellen wurde von Sabrina Wendt (AG Kramer, Institut für Medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin) durchgeführt.

Für das relative Quantifizieren mittels  $^{15}\text{N}$ -Labeling wurden HEK293/PER2-V5 und HEK293/Per2-V5 + huPPP2R2B Zellen in 35 mm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Die Isotopenmarkierung fand in dem in Abbildung 9.2 gezeigten Schema statt. Zu Beginn der Isotopenmarkierung wurde das gesamte Nähr-



**Abbildung 9.2** – Arbeitsablauf für das  $^{15}\text{N}$ -Isotopenlabeling der HEK293/Per2-V5 Zellen; die Zellen wurden jeweils nach dem obigen Schema passagiert und expandiert. Das Medium der HEK293/PER2-V5 Zellen enthält  $^{14}\text{N}$ -Stickstoff, das Medium der HEK293/PER2-V5 + huPPP2R2B Zellen  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff.

medium abgenommen und jeweils 2 ml *Bioexpress 6000 Vollmedium* zu den Zellen gegeben. Dabei setzte sich das Medium für die unmarkierten Zellen aus *Bioexpress 6000 mammalian (unlabeled)* (EURISO-TOP GmbH, Saarbrücken bzw. Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA), 10 % dialysiertem *Fetal Bovine Serum* (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) und 1 % Penicillin/Streptomycin 100× (PAA Laboratories GmbH) in 25 mM HEPES Puffer zusammen. Das Medium für die markierten Zellen enthielt bis auf

## 9 Relative Quantifizierung der mPER2-Phosphorylierung mittels $^{15}\text{N}$ -Labeling

Bioexpress 6000, welches durch *Bioexpress 6000 mammalian U- $^{15}\text{N}$  98 %* ersetzt war, die gleiche Zusammensetzung. Somit beinhaltet das Medium der HEK293/Per2-V5 Zellen  $^{14}\text{N}$ -Stickstoff (unmarkiert), das Medium der HEK293/PER2-V5 + huPPP2R2B Zellen ist mit  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff versetzt (markiert).

Bei jeder der 5 Passagen wurden die Zellen mit 250  $\mu\text{l}$  Trypsin versetzt und 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit 150  $\mu\text{l}$  Medium abgestoppt und 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension passagiert. Die beiden Zelllinien wurden hierbei exakt gleich behandelt. Nach 5 Passagen wurden die Zelllinien auf jeweils 1  $\times$  10 cm Zellkulturschale mit 7 ml Medium expandiert. Wenn diese zu 100 % konfluent war, wurde auf jeweils 5  $\times$  20 cm Zellkulturschalen mit je 20 ml Medium umgesäht. Die Zellernte wurde durchgeführt wenn diese Zellen zu 100 % konfluent waren.

### 9.2.2 Zellernte

Die Zellen pro Zellkulturschale wurden einmal mit je 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit einer Temperatur von 0 °C gewaschen, vollständig abgenommen und dann 3 ml Co-IP-Lysispuffer mit einer Temperatur von 0 °C dazugegeben, welcher einen Proteaseinhibitor-Cocktail enthielt. Direkt im Anschluss wurde die Zellkulturschale im Kühlschrank auf den Wipptisch gestellt und geschüttelt, bis sich die Zellen von alleine lösten (ca. 10 min). Die Lysate wurden jeweils in einem 15 ml Falcongefäß vereinigt, auf dem Rotationsschüttler gemischt, nach einer Zwischenkühlung mit einer Kanüle homogenisiert und auf 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Danach wurden die unlöslichen Zellbestandteile für 30 Minuten bei 4 °C und mindestens 13 000 rpm abzentrifugiert und die geklärten Lysate im Falcongefäß wiedervereinigt. Mittels BCA-Test (Smith et al., 1985) wurde dann die Proteinkonzentration bestimmt. Es wurde außerdem im Western blot (Renart et al., 1979) pro Lysat eine Verdünnungsreihe von 1:1,5 durchgeführt, um vor der Immunopräzipitation von beiden Lysaten die gleiche Menge an mPER2 mischen zu können. Aufgrund der Ergebnisse der Verdünnungsreihe wurden für den ersten Versuch 15 ml des  $^{14}\text{N}$ -Lysates und 7,5 ml des  $^{15}\text{N}$ -Lysates gemischt (Verhältnis  $^{14}\text{N}$ : $^{15}\text{N} \hat{=}$  2:1). Die gemischten Lysate mit einem Volumen von 22,5 ml wurden mit Co-IP-Lysispuffer, welcher mit Proteaseinhibitor-Cocktail versetzt war, auf 30 ml aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Immunopräzipitation wie in Abschnitt 3.4.2 auf Seite 32 beschrieben durchgeführt.

### 9.2.3 Probenvorbereitung und Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$

Die Proben wurden wie in Kapitel 3 ab Seite 31 beschrieben nach vorangehender Reduktion und Alkylierung auf ein Invitrogen-Gel gegeben und nach dem Entfärben und Trocknen mit den Proteasen Trypsin, Elastase und Thermolysin verdaut. Die Peptide wurden anschließend aus dem Gel extrahiert und für jeden Proteaseverdau einzeln einer Anreicherung der Phosphopeptide mittels  $\text{TiO}_2$  unterzogen. Die mobile Phase des Belade- und des Waschschrates wurden in einem Vial gesammelt, das Eluat des Elutionsschrittes in einem zweiten Vial. Das Vial mit dem Eluat wurde im Anschluss direkt am Q-TOF gemessen. Der Inhalt des Vials mit der mobile Phase des Belade- und

Waschschrittes wurde vor der Messung auf ein Volumen von ca. 20 µl eingengt. Die Auswertung der Daten erfolgte manuell mit MassHunter Qualitative Analysis (B.04.00) SP1 und Microsoft Excel 2007 SP2 (Microsoft, Redmont, WA, USA).

## 9.3 Ergebnisse

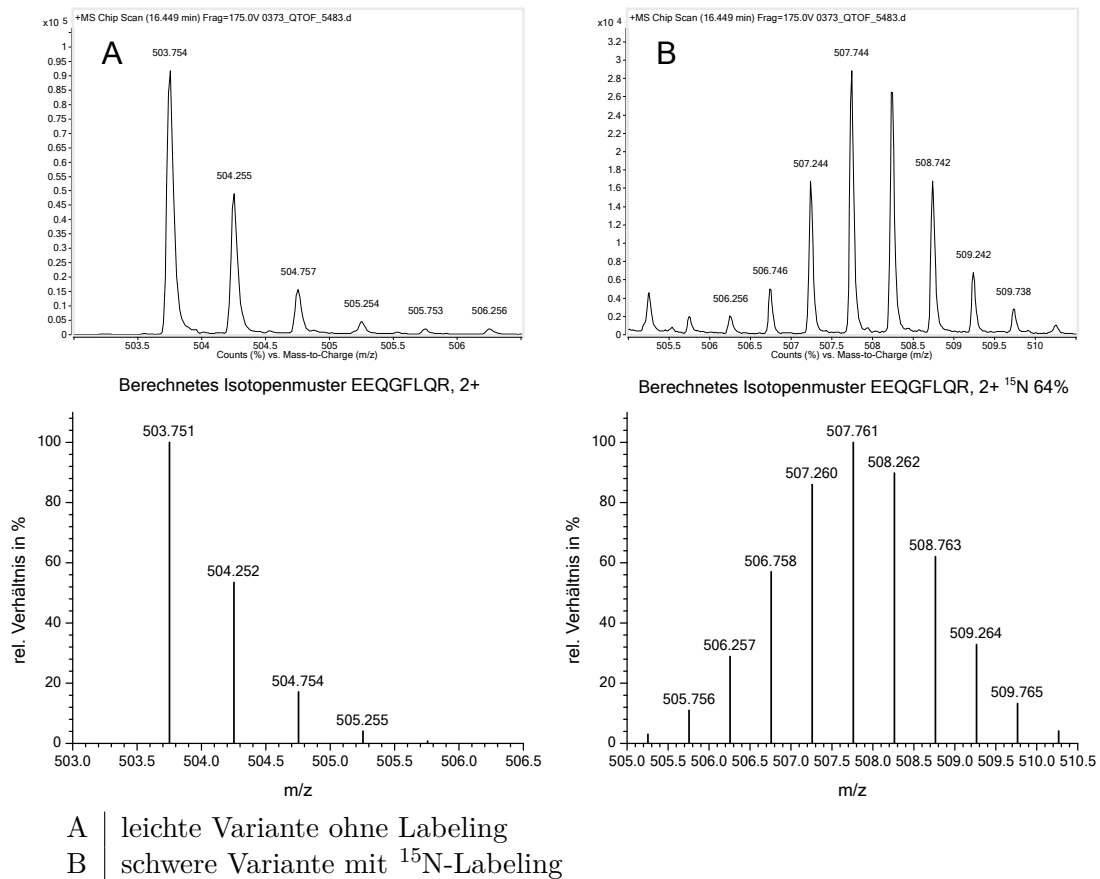
### 9.3.1 Qualität des Labelings

Bei der Auswertung der Daten fiel auf, dass die Isotopenmuster der mit  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff markierten Proben ein unvollständiges Labeling mit dem schweren Stickstoffisotop aufwiesen. Dies ließ sich an dem breiten Isotopenmuster der markierten Peptide erkennen. Wie in Abbildung 9.3 auf Seite 130 erkennbar ist, weist das Isotopenmuster des schweren Peptids EEQGFLQR nur eine Einbaurate von ca. 64 % auf. Außerdem ist zu erkennen, dass das berechnete Isotopenmuster für eine gleichmäßige Einbaurate von  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff von dem real gemessenen Isotopenmuster abweicht. Dies kann darauf hindeuten, dass die verschiedenen Aminosäuren mit einer unterschiedlichen Rate an  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff markiert wurden oder dass die Isotopenmarkierung in der Zellkultur verloren ging. Ein ähnliches Bild ist auch bei dem Phosphopeptid ApSPPLFQSR in Abbildung 9.4 auf Seite 131 zu sehen. Das Labeling der schweren Variante scheint einige Prozentpunkte besser zu sein als das des Peptids EEQGFLQR, was ebenfalls auf einen unterschiedlichen Grad an  $^{15}\text{N}$ -Labeling in Abhängigkeit zur Sequenz hindeutet.

Dabei ist unklar, warum die Isotopenmarkierung auch nach acht Zellteilungen keine höhere Einbaurate aufweist. Beim metabolischen Labeling von Ratten und Mäusen wurden nach 44 bzw. 56 Tagen Einbauraten des  $^{15}\text{N}$ -Labels von größer 90 % gefunden (McClatchy et al., 2007; Frank et al., 2009). Für das  $^{15}\text{N}$ -Labeling mit *Bioexpress 6000 mammalian U-15N 98 %* in Zellkultur liegen allerdings bislang keine Vergleichswerte für den Einbau der Isotopenmarkierung vor. Aus dem Umstand, dass die Peptide keinen einheitlichen Grad an  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung aufwiesen, ergaben sich Probleme für die automatische Datenauswertung. Die von uns verwendete Mascot Distiller *Quantitation Toolbox* kann zwar ein unvollständiges Labeling berücksichtigen, dies funktioniert allerdings nur bei einem relativ hohen Grad an Isotopenmarkierung und bei gleichmäßigem Vorhandensein dieser für alle Peptide.

Daher wurden die Daten für die  $^{15}\text{N}$ -markierten Proben manuell ausgewertet. Als Software wurde dafür MassHunter Qualitative Analysis verwendet. Aus den Mascot-Suchergebnissen wurde zuerst die Masse des leichten Peptids herausgesucht. Für dieses wurde dann in MassHunter Qualitative Analysis ein Extracted-Ion-Chromatogramm (EIC) erstellt, um den entsprechenden Peak im Chromatogramm zu ermitteln. Im Bereich dieses Peaks wurden dann im MS-Spektrum die entsprechenden Massenbereiche der Peptide für die leichte und die schwere Variante der Isotopenmarkierung herausgesucht, siehe Abbildung 9.5 auf Seite 132. Die Abbildung zeigt dieses Vorgehen beispielhaft für ein unphosphoryliertes Peptid (A) und ein phosphoryliertes Peptid (B). Anschließend wurden für die Massenbereiche der jeweiligen Isotopenmuster neue EICs erstellt, welche den gesamten Massenbereich der Isotopenverteilung umfassten. Dabei war dar-

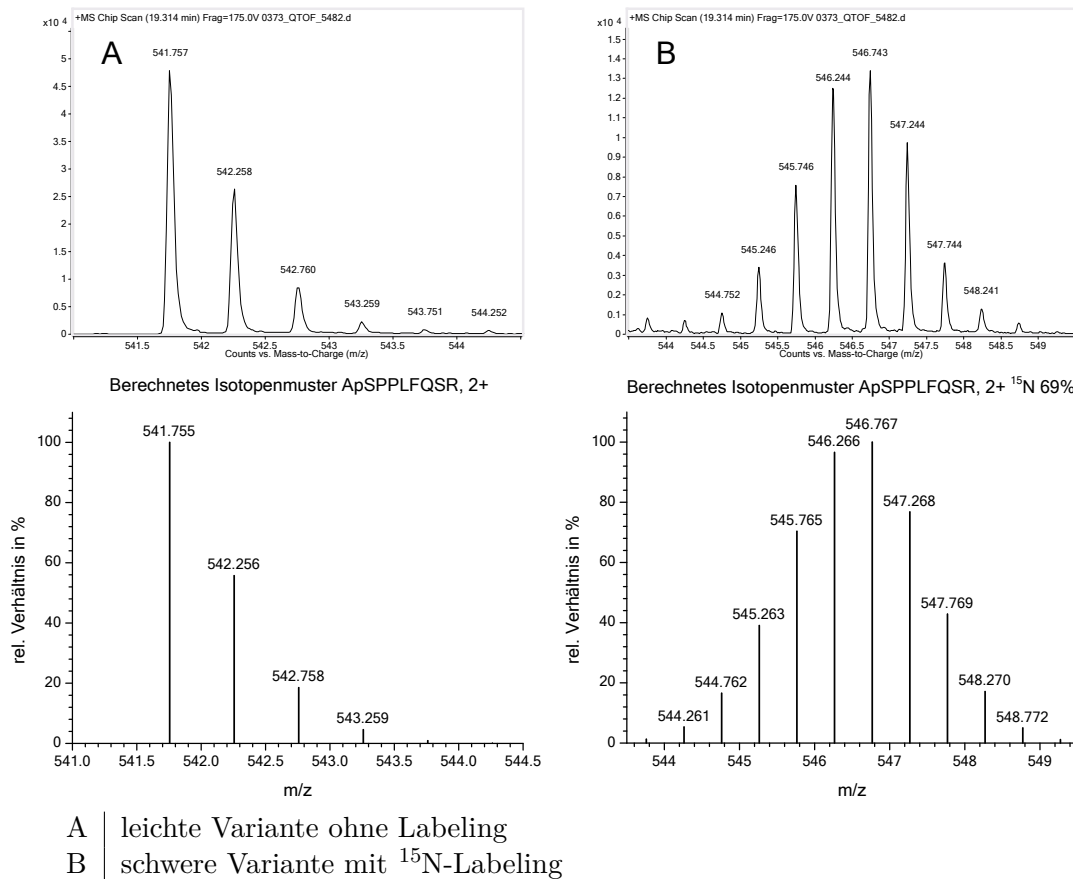
## 9 Relative Quantifizierung der mPER2-Phosphorylierung mittels $^{15}\text{N}$ -Labeling



**Abbildung 9.3** – Vergleich der gemessenen und berechneten Isotopenmuster von EEQGFLQR, 2+ leichte und schwere Variante; die Einbaurate des  $^{15}\text{N}$ -Stickstoffes beim schweren Label liegt bei ca. 64 %.

auf zu achten, dass es über den Verlauf des Peaks zu keiner isobaren Überlappung mit anderen gemessenen Substanzen kam, welche das Ergebnis verfälscht hätten. Von den somit neu erstellten Extracted-Ion-Chromatogrammen wurde anschließend manuell jeweils der Peak der leichten und der schweren Form zur Flächenbestimmung integriert. Abbildung 9.6 auf Seite 133 zeigt die Ermittlung der Peakflächen für ein unphosphoryliertes Peptid (A) und ein phosphoryliertes Peptid (B). Die ermittelten Werte wurden anschließend in eine Microsoft Excel 2007 Tabelle überführt, mit welcher auch die Verhältnisse von leichter Variante zu schwerer Variante berechnet wurden. Das gleiche Verfahren bei der Auswertung wurde für alle Peptide angewandt. Peptide, welche isobare Überlappungen über den zu integrierenden Bereich zeigten, wurden von der Quantifizierung ausgeschlossen.

Da bei der mit  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff markierten Zellkultur die Phosphatase PP2A überexprimiert ist, wäre bei Phosphopeptiden, welche durch diese Phosphatase reguliert werden, zu erwarten, dass die Menge an entsprechendem Phosphopeptid in der markierten Pro-



**Abbildung 9.4** – Vergleich der gemessenen und berechneten Isotopenmusters von ApSPPLFQSR, 2+ leichte und schwere Variante; die Einbaurate des  $^{15}\text{N}$ -Stickstoffes beim schweren Label liegt bei ca. 69 %.

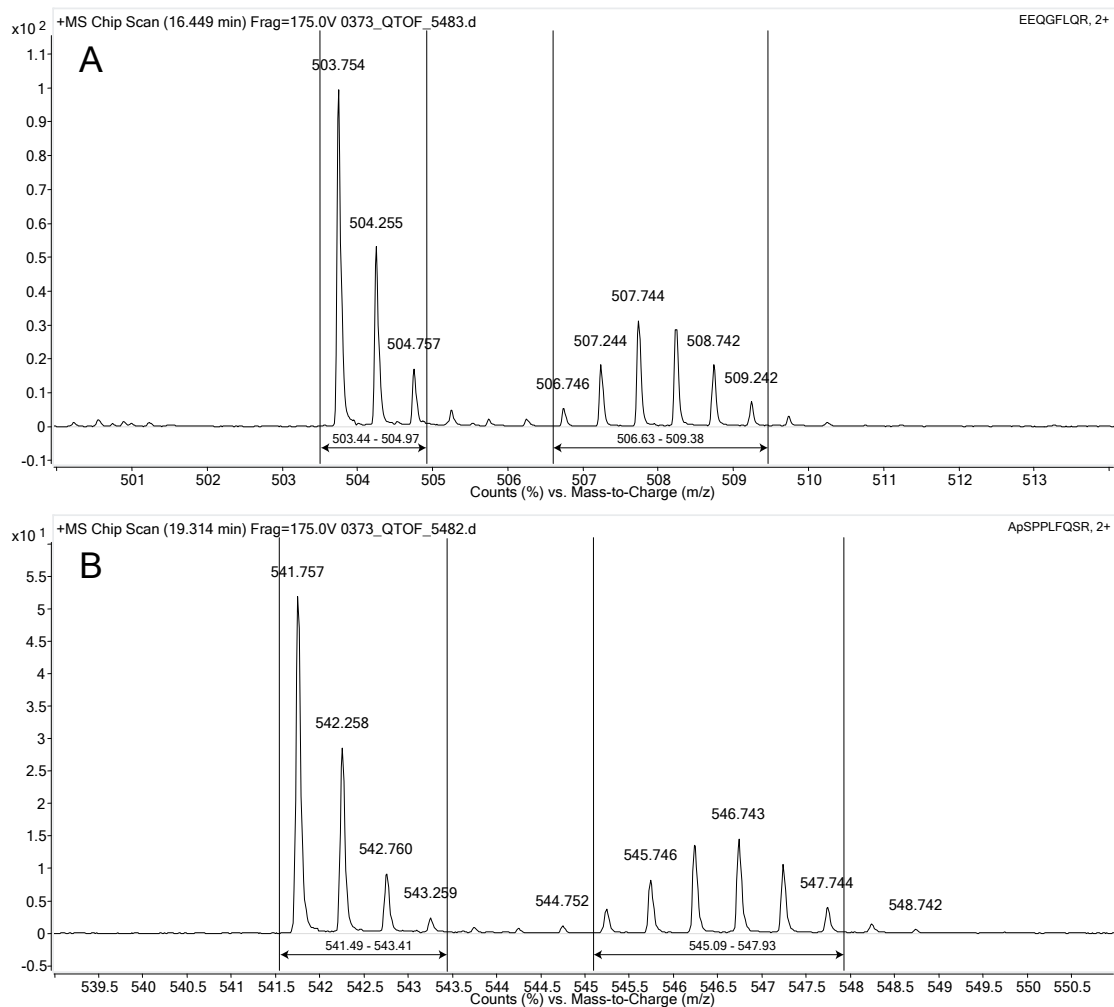
be geringer ist als in der unmarkierten Probe. Dies würde sich beim entsprechenden Phosphopeptid durch einen erhöhten Quotienten des Verhältnisses von leichter Probe zu schwerer Probe widerspiegeln.

### 9.3.2 Ergebnisse der Quantifizierung mit $^{15}\text{N}$ markierten Proben

#### Erster Versuch

Für den ersten Versuch wurde jeweils eine Bande des Polyacrylamid-Geles für den Verdau mit einer Protease verwendet. Die Ergebnisse für die drei Proteasen sind in den Tabellen 4 bis 6 auf Seiten 229 bis 231 im Anhang zu finden. In der Spalte „Mod“ sind Proteinmodifizierungen mit Ausnahme der Phosphorylierung zu finden, welche separat in der Spalte „Phospho“ aufgelistet ist. In der Spalte „Peptid“ sind die entsprechenden Aminosäuren **rot** und **blau** dargestellt, wenn die Phosphorylierung genau bzw. nicht genau lokalisiert werden konnte. Die Modifikationen sind wie in Tabelle 9.1 auf Seite 134

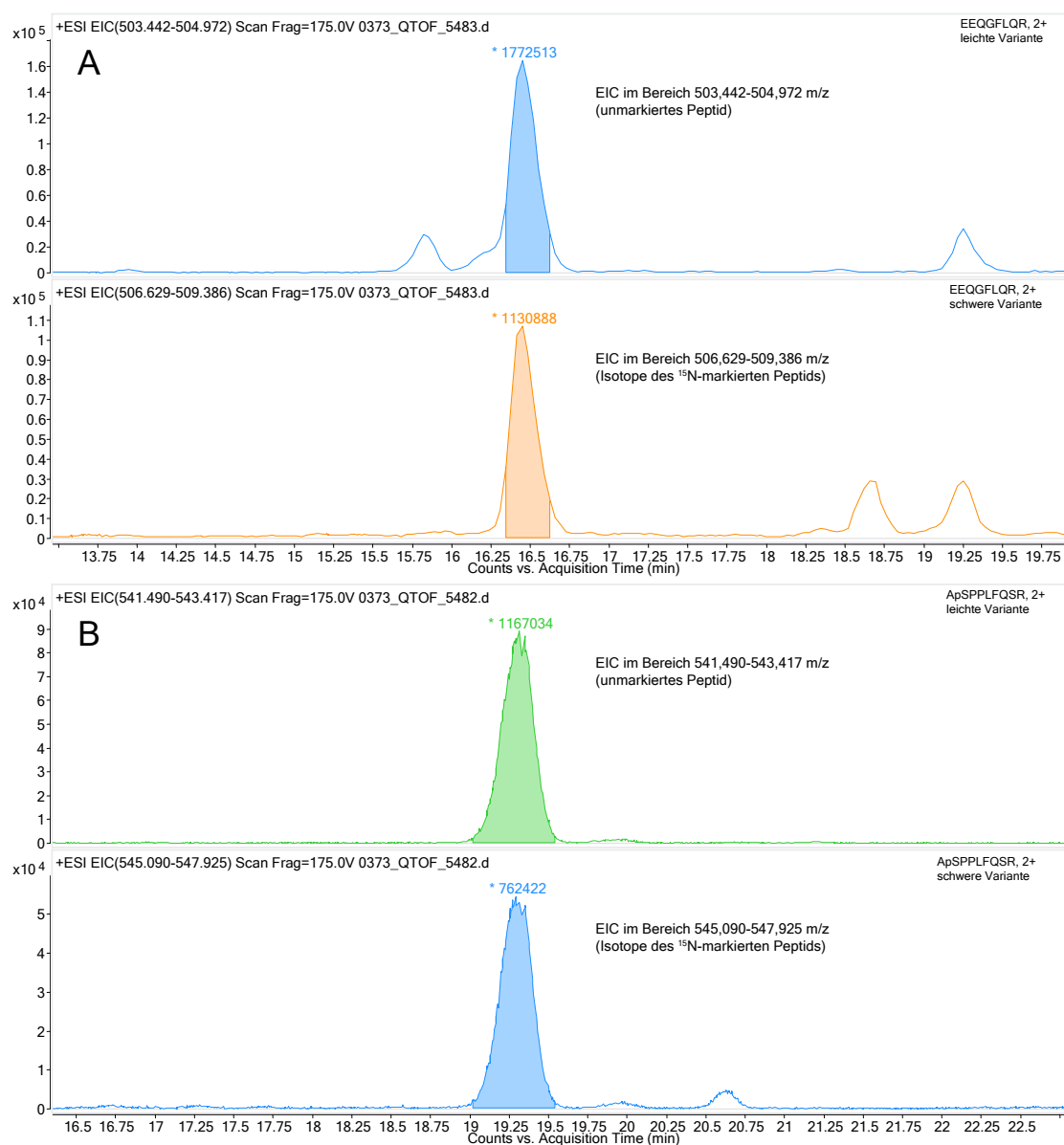
## 9 Relative Quantifizierung der mPER2-Phosphorylierung mittels $^{15}\text{N}$ -Labeling



**Abbildung 9.5** – Für die Erstellung der Extracted-Ion-Chromatogramme verwendete Bereiche des Isotopenmusters von EEQGFLQR, 2+ (A) und ApSPPLFQSR, 2+ (B); die EICs werden jeweils für den Bereich des Isotopenmusters der leichten und schweren Peptidvariante erstellt.

aufgelistet abgekürzt. Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, ergibt sich für alle Peptide auch beim Verdau mit verschiedenen Proteasen ein Mittelwert von Mittelwert von 1,48 (Standardabweichung  $\pm 0,11$ ) für das Verhältnis von leichter zu schwerer Probe. Die Mittelwerte betrugen für den Verdau mit Trypsin 1,48 ( $\pm 0,10$ ), für den Verdau mit Elastase 1,49 ( $\pm 0,09$ ) und für den Verdau mit Thermolysin 1,47 ( $\pm 0,12$ ).

Abweichungen des Peptidverhältnisses, welche auf eine veränderte Phosphorylierung hindeuten würden, waren bei diesem erstem Versuch nur bei dem Peptid LRQPCACPV-pTPPAGT (T-959) des Thermolysinverdaus zu beobachten. Es handelt sich hierbei allerdings um keine wesentliche Abweichung vom Mittelwert des Verhältnisses zwischen



**Abbildung 9.6** – Integrierte Extracted-Ion-Chromatogramme für den leichten und schweren Bereich des Isotopenmusters von EEQGFLQR, 2+ (A) und ApSPPLFQSR, 2+ (B); die Extracted-Ion-Chromatogramme wurden jeweils über den in Abbildung 9.5 gezeigten Bereich für das unmarkierte und das  $^{15}\text{N}$ -markierte Peptid erstellt. Anschließend wurden die Peakflächen integriert und die ermittelten Werte in Excel übertragen, um das Verhältnis Leicht:Schwer zu berechnen.

## 9 Relative Quantifizierung der mPER2-Phosphorylierung mittels $^{15}\text{N}$ -Labeling

Mod	Modifikation
1	Carbamidomethylierung
2	Methionin-Oxidation
3	Desamidierung
4	N-Terminale Acetylierung
5	Pyro-Glutamat (N-terminal)

**Tabelle 9.1** – Zuordnung der Modifikationen

leichter und schwerer Probe.

### Zweiter Versuch

Beim ersten Versuch wurden durch die geringe Proteinmenge nur wenige Peptide von mPER2 gefunden. Aus diesem Grund wurde der Versuch mit einem größeren Immunopräzipitations-Ansatz wiederholt. Die Proben wurden aufgrund der größeren Menge an Material auf zwei Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Anschließend wurden jeweils mehrere Banden mit einer Protease verdaut und dann die Extrakte für die Phosphopeptidanreicherung mit  $\text{TiO}_2$  vereinigt. Da die Ausbeute des Verdaus mit Trypsin höher ist, wurden für den tryptischen Verdau drei Gelbanden, für den Verdau mit Elastase und Thermolysin jeweils vier Gelbanden verwendet.

Die Ergebnisse der Quantifizierung für den zweiten Versuch sind in den folgenden Tabellen 9.2 bis 9.4 ab dieser Seite bis Seite 138 zu finden.

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
MLVSSNTHPSPDDAFR	–	–	3+	0,95
MLVSSNTHPSPDDAFR	2	–	3+	1,03
MLVSSNTHPSPDDAFR	–	S-74	3+	1,13
MLVSSNTHPSPDDAFR	2	S-74	3+	1,05
LMMTEAEHNPSTSGCSSEQSAK	1	–	3+	1,05
LMMTEAEHNPSTSGCSSEQSAK	2,1	–	3+	1,01
LMMTEAEHNPSTSGCSSEQSAK	2,2,1	–	3+	0,97
ILYISNQVASIFHCK	1	–	3+	1,05
FVEFLAPHDVSVFHSYTPYK	–	–	3+	0,99
FVEFLAPHDVSVFHSYTPYK	–	–	4+	1,01
VQEQQGAESQLCCLLLAER	1,1	–	2+	1,03
VQEQQGAESQLCCLLLAER	1,1	–	3+	0,97
IFTTHTPNCLFQAVDER	1	–	3+	1,02
ILQAGGQPFDYSPIR	–	–	2+	1,06
VGPLNEDVFAASPCPEEK	1	–	2+	1,02
TPHPSVQELTEQIHR	–	–	3+	1,08
TPHPSVQELTEQIHR	–	–	4+	1,03

Fortsetzung auf nächster Seite



Fortgesetzt von letzter Seite

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
EASVAEMQSSPPAQVK	2	-	2+	1,06
EASVAEMQSSPPAQVK	-	-	2+	1,02
EASVAEMQSPPAQVK	-	S-545	2+	1,03
NQPPCSYQQISCLDSVIR	1,1	-	2+	1,06
NQPPCSYQQISCLDSVIR	1,1	-	3+	0,99
YLESCSEAATLK	1	-	2+	1,06
KATVSPGLHSGEAARPSK	-	-	4+	0,98
KATVSPGLHSGEAARPSK	-	S-624	4+	1,06
ATVSPGLHSGEAARPSK	-	-	4+	1,02
ATVSPGLHSGEAARPSK	-	-	3+	0,99
ATVSPGLHSGEAARPSK	-	S-624	3+	1,00
ATVSPGLHSGEAARPSK	-	S-624	3+	1,11
VTSHTEVSAHLSSLTPGK	-	-	4+	1,05
AESVVSLSQCSYSTIVHVGDK	1	S-662 1×664/- 665/668/669	3+	0,99
AESVVSLSQCSYSTIVHVGDK	1	S-662 1×665/- 668/669	3+	1,05
AESVVSLSQCSYSTIVHVGDK	1	4×Phos. Iso1	3+	1,06
AESVVSLSQCSYSTIVHVGDK	1	4×Phos. Iso2	3+	0,99
KPQPELETVEDMASGPESLDGAAGGLSQEK	-	-	3+	1,05
KPQPELETVEDMASGPESLDGAAGGLSQEK	2	-	3+	1,11
KPQPELETVEDMASGPESLDGAAGGLSQEK	2	-	3+	1,07
KPQPELETVEDMASGPESLDGAAGGLSQEK	-	S-693 S-697	3+	1,01
KPQPELETVEDMASGPESLDGAAGGLSQEK	-	1×693/697	3+	0,99
KPQPELETVEDMASGPESLDGAAGGLSQEK	2	S-693 S-697	3+	0,96
KPQPELETVEDMASGPESLDGAAGGLSQEK	2	1×693/697	3+	0,98
KPQPELETVEDMASGPESLDGAAGGLSQEK	-	-	3+	1,06
EEQGFLLR	-	-	2+	1,04
NTSGLESSWK	-	-	2+	1,07
QPCACPVTTPAGTVALGR	1,1	-	2+	0,93
ASPPLFQSR	-	S-971	2+	1,09
SGASATSDSLGSSSLGFGTSQSGAGSSDTSHTSK	-	-	3+	0,98
YFGSIDSENHNK	-	-	3+	1,01
YFGSIDSENHNK	-	S-1107 1×1110/1111	2+	0,95
YFGSIDSENHNK	-	S-1107 1×1110/1111	3+	0,95
MIPDTEESEQFIK	-	-	2+	0,99
MIPDTEESEQFIK	2	-	2+	1,05
DLQAVLKEDQEK	-	-	2+	1,03
DLQAVLKEDQEK	-	-	3+	0,99
DLQAVLKEDQEK	-	-	2+	0,97
GNICLPYEEDSPSPGLCDTSEAKEEEGEQLTGPR	1,1	-	4+	0,92
GNICLPYEEDSPSPGLCDTSEAKEEEGEQLTGPR	1,1	-	4+	0,95
GNICLPYEEDSPSPGLCDTSEAKEEEGEQLTGPR	1,1	S-1231	4+	1,11

Fortsetzung auf nächster Seite

# 9 Relative Quantifizierung der mPER2-Phosphorylierung mittels <sup>15</sup>N-Labeling

Fortgesetzt von letzter Seite

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <sup>Leicht</sup> / <sub>Schwer</sub>
GNICLPYEEDSPSPGLCDTSEAKEEEGEQLTGPR	1,1	S-1229 S-1231	4+	1,14
VVDLEGPR	-	-	2+	1,10
FEGKPIPNNLLGLDSTR	-	-	2+	0,97
FEGKPIPNNLLGLDSTR	-	-	3+	1,01
Mittelwert (Standardabweichung)				1,02 (±0,05)

**Tabelle 9.2** – mPER2 <sup>15</sup>N-Quantifizierung des Trypsinverdaus (zweiter Versuch); Verhältnisse der quantifizierten Peptide aus Eluat und Waschfraktion der Phosphopeptidanreicherung von drei vereinigten Gelbanden

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <sup>Leicht</sup> / <sub>Schwer</sub>
MNGYVDFSPSPTSPTKEPGAPQPT	4,2,3	1×8/10/12/13/15	3+	0,99
MNGYVDFSPSPTSPTKEPGAPQPT	4,2,3	1×8/10/12/13/15	3+	1,00
MNGYVDFSPSPTSPTKEPGAPQPT	4,2,3	2×8/10/12/13/15	3+	1,09
SNTHSPDDAFRL	-	-	3+	1,03
SNTHSPDDAFRL	-	S-74	3+	1,02
KQVKANEEYYQLL	-	-	3+	1,04
FHCKKDAFSDA	1	-	2+	0,97
FHCKKDAFSDA	1	-	3+	1,07
KFVEFLAPHDVS	-	-	3+	0,93
RYQPFRMTPYLV	-	-	3+	1,07
RYQPFRMTPYLV	2	-	3+	0,94
HSGYEAPRIPPEKRI	-	-	4+	1,04
HSGYEAPRIPPEKRI	-	-	4+	1,02
FQAVDERAVPL	-	-	2+	1,05
YLPQDLIETPV	-	-	2+	0,98
QLHPSDRPLMLA	5	-	2+	1,01
RFRTNRNGEYITL	3	-	3+	1,03
TRNGEYITLDT	3	-	2+	0,98
SFINPWSRKI	-	-	3+	1,02
SPCPEEKTPHPSVQELTEQI	1	-	3+	0,97
SVAEMQSSPPAQV	2	S-545	2+	1,06
SVAEMQSSPPAQV	2	-	2+	0,98
YKNQPPCSYQI	1	-	2+	1,07
TVSPGLHSGEAAARPS	-	S-624	2+	1,05
TVSPGLHSGEAAARPS	-	S-624	3+	1,12
HVGDKKPQPELETV	-	-	3+	1,02
HVGDKKPQPELETV	-	-	3+	1,03

Fortsetzung auf nächster Seite

Fortgesetzt von letzter Seite

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
EDMA <del>S</del> GPE <del>S</del> LDGAAGGLS <del>S</del> QEKGPLQKL	2	S-693 S-697	3+	0,98
EDMA <del>S</del> GPE <del>S</del> LDGAAGGLS <del>S</del> QEKGPLQKL	-	S-693 S-697	3+	1,03
EDMASGPESLDGAAGGLS <del>S</del> QEKGPLQKL	2	-	3+	1,02
EDMA <del>S</del> GPE <del>S</del> LDGAAGGLS <del>S</del> QEKGPLQKL	2	1×693/697	3+	0,98
HTQREEQGFLQR	-	-	3+	1,03
SHRPPLMGL	-	-	2+	1,02
HTGFTMPVVPMGTQPEFA	-	-	2+	0,98
HTGFTMPVVPMGTQPEFA	2	-	2+	1,01
STLRQPCACP <del>V</del>	1,1	-	2+	0,99
ALGRA <del>S</del> PPLFQSRG <del>S</del> SPLQL	-	S-971 S-981	3+	0,99
ALGRA <del>S</del> PPLFQSRG <del>S</del> SPLQL	-	S-971 S-980	3+	1,10
		S-981		
RAS <del>S</del> PPLFQSRG <del>S</del> SPLQL	-	S-971 S-980	3+	1,21
		S-981		
RAS <del>S</del> PPLFQSRG <del>S</del> SPLQL	-	S-971 S-981	3+	0,97
RAS <del>S</del> PPLFQSRG <del>S</del> SPLQL	-	S-971 S-980	2+	1,20
		S-981		
KMIPDTEESEQFI	-	-	2+	1,07
KYVLQDPIWLL	-	-	2+	0,99
KYVLQDPIWL	-	-	2+	1,01
KYVLQDPI	-	-	2+	1,04
YQLPSRDLQAV	-	-	2+	1,03
DLEGPRFEGKPIP <del>N</del> PLLGLDSTR <del>T</del>	-	-	4+	0,97
DLEGPRFEGKPIP <del>N</del> PLLGLDST	-	-	3+	1,03
Mittelwert (Standardabweichung)				1,03 (±0,05)

**Tabelle 9.3** – mPER2 <sup>15</sup>N-Quantifizierung des Elastaseverdaus (zweiter Versuch); Verhältnisse der quantifizierten Peptide aus Eluat und Waschfraktion der Phosphopeptidanreicherung von vier vereinigten Gelbanden

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
VDF <del>S</del> P <del>S</del> P <del>S</del> T <del>S</del> P <del>T</del> KEPGAPQPTQA	-	1×8/10/12/13/15	3+	0,99
VDF <del>S</del> P <del>S</del> P <del>S</del> T <del>S</del> P <del>T</del> KEPGAPQPTQA	-	2×8/10/12/13/15	3+	0,98
F <del>S</del> P <del>S</del> P <del>S</del> T <del>S</del> P <del>T</del> KEPGAPQPTQA	-	1×8/10/12/13/15	3+	0,98
LVESSNTHP <del>S</del> PDDAFRL	-	S-74	3+	0,99
LVESSNTHPSPDDAFR	-	-	3+	1,04
LVESSNTHP <del>S</del> PDDAFR	-	S-74	3+	1,02
LVESSNTHPSPDDA	-	-	2+	1,02

Fortsetzung auf nächster Seite

# 9 Relative Quantifizierung der mPER2-Phosphorylierung mittels <sup>15</sup>N-Labeling

Fortgesetzt von letzter Seite

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
LAPHDVSVFHS	-	-	3+	1,03
VHSGYEAPRIPPEKR	-	-	4+	1,10
VRVGPLNEDVFA	-	-	2+	1,01
VRVGPLNEDVF	-	-	2+	0,99
LTEQIHRL	-	-	3+	1,02
LMQPVPHSGSSGYGS	-	-	2+	1,04
LMSQTSSSDSNQGEESHRRRSG	3	-	4+	1,01
VAEMQSPPAQVKA	-	S-545	2+	0,98
IERDSSGASLPKA	-	-	3+	1,04
LAYKNQPPCSYQQ	1	-	2+	1,00
LDSVIRY	-	-	2+	1,00
LHSGEAAARPSKVTSHTEVSAH	-	-	5+	1,06
IVHVGDKKPQPELETVEDMASGPES	-	-	4+	1,03
LDGAAGGLSQEKGPLQK	-	-	3+	1,06
VLAHTQREEQGF	-	-	3+	1,06
AWSPSDTSQSSCPSAPFPT	1	-	2+	1,00
IVSTPGTVVAPPAATHTG	-	-	2+	0,98
MLPSYFPFPATPNLPQA	-	-	2+	1,00
FLPSQPHFPAHPT	-	-	3+	1,02
LASEITPASQAEFPSRTST	-	-	2+	1,02
LRQPCACPVTPPAGT	1,1	T-959	2+	1,40
LRQPCACPVTPPAGT	1,1	-	2+	0,98
LGRASPPLFQSRGSSPLQ	-	S-971 S-980 S-981	3+	1,10
LGRASPPL	-	S-971	2+	1,04
FQSRGSSPLQLNL	-	S-980 S-981	2+	1,07
FQSRGSSPLQLN	-	S-980 S-981	2+	1,05
LLQLEEAPEGSTGAAGT	-	-	2+	0,97
LSRSGASATSDSLGSSS	-	-	2+	1,07
LGFGTSQSGAGSSDTSHTSKY	-	-	3+	0,99
FGTSQSGAGSSDTSHTSKY	-	-	3+	1,02
IEAQTKGGRADPAF	-	-	3+	0,99
Mittelwert (Standardabweichung)				1,03 (±0,07)

**Tabelle 9.4** – mPER2 <sup>15</sup>N-Quantifizierung des Thermolysinverdaus (zweiter Versuch); Verhältnisse der quantifizierten Peptide aus Eluat und Waschfraktion der Phosphopeptidanreicherung von vier vereinigten Gelbanden

Der Gesamtmittelwert der Peptidverhältnisse betrug 1,03 mit einer Standardabweichung von 0,06. Die einzelnen Mittelwerte lagen bei den Messungen bei 1,02 (±0,05) für den Verdau mit Trypsin, 1,03 (±0,05) für den Verdau mit Elastase und 1,03 (±0,07) für den Verdau mit Thermolysin. Auch bei dieser Versuchsreihe waren keine Änderungen des Verhältnisses zwischen leichter und schwerer Probe zu beobachten, bis auf die Ände-

rung beim Peptid LRQPCACPVpTPPAGT (T-959) des Thermolysinverdaus. Bei diesem Peptid war erneut ein vom Mittelwert abweichendes Verhältnis von leichter zu schwerer Probe von 1,40 zu beobachten.

### Zweiter Versuch; erneute Messung von Banden mit Thermolysinverdau

Die Messung mit einem erneuten Verdau mit Thermolysin und Phosphopeptidanreicherung wurde mit 3 Gelbanden wiederholt, um die Ergebnisse der ersten beiden Messungen für das Peptid LRQPCACPVpTPPAGT (T-959) zu bestätigen.

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
FSPSPTSPKEPGAPQPTQA	-	1×8/10/12/13/15	2+	0,99
FSPSPTSPKEPGAPQPTQA	-	1×8/10/12/13/15	3+	0,99
FSPSPTSPTKEPGAPQPTQA	-	-	2+	1,06
LVESNTHPSDDAFRL	-	S-74	3+	1,08
LVESNTHPSPDDA	-	-	2+	1,03
LAPHDVSVFHS	-	-	3+	1,03
LVKVQEQQGAESQ	-	-	2+	1,00
VHSGYEAPRIPPEKR	-	-	4+	1,07
LGYPQLDIETPVLVQ	-	-	2+	1,04
VRVGPLNEDVFA	-	-	2+	1,02
VRVGPLNEDVF	-	-	2+	1,01
IERSGASLPKA	-	-	3+	1,05
LAYKNQPPCSYQQ	1	-	2+	1,00
IVHVGDKKPQPELETVEDMASGPES	-	-	4+	1,02
VGDKKPQPELETVEDMASGPES	-	-	3+	1,00
LDGAAGGLSQEKGPLQK	-	-	3+	1,02
LRNTSGLESSWKK	-	-	4+	1,02
AWSPSDTSQSSCPSPAPFT	1	-	2+	1,02
FMLPSYFPFPATPNLPQA	-	-	2+	0,99
FMLPSYFPFPATPNLPQA	2	-	2+	1,02
MLPSYFPFPATPNLPQA	-	-	2+	0,99
FLPSQPHFPAHPT	-	-	3+	1,02
LASEITPASQAEFPSRTST	-	-	2+	1,01
LASEITPASQAEFPSRTST	-	-	3+	1,02
ITPASQAEFPSRTST	-	-	2+	1,05
LRQPCACPVTPPAGT	1,1	-	2+	1,01
LRQPCACPVTPPAGT	1,1	T-959	2+	1,44
LGRASPPL	-	S-971	2+	1,01
FQSRGSSPLQ	-	S-981	2+	0,97
LLQLEEAPEGSTGAAGT	-	-	2+	1,01
LSRSGASATSDSLGSSS	-	-	2+	1,04
LGFGTSQSGAGSSDTSHTSKY	-	-	3+	1,00
FGTSQSGAGSSDTSHTSKY	-	-	3+	1,04

Fortsetzung auf nächster Seite

## 9 Relative Quantifizierung der mPER2-Phosphorylierung mittels $^{15}\text{N}$ -Labeling

Fortgesetzt von letzter Seite

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
VHPWHTGGLPTA	–	–	3+	1,03
IEAQTGGGRADPAF	–	–	3+	1,01
FEGKPIPNP	–	–	2+	1,05
Mittelwert (Standardabweichung)				1,03 ( $\pm 0,07$ )

**Tabelle 9.5** – mPER2  $^{15}\text{N}$ -Quantifizierung des zweiten Thermolysinverdaues (zweiter Versuch); Verhältnisse der quantifizierten Peptide aus Eluat und Waschfraktion der Phosphopeptidanreicherung von drei vereinigten Gelbanden

Der Mittelwert der Peptidverhältnisse beim erneuten Verdau der Probe des zweiten Versuches mit Thermolysin war 1,03 mit einer Standardabweichung von 0,07. Auch hier war ein abweichendes Verhältnis von leichter zu schwerer Probe von 1,44 beim Peptid LRQPCACPvP<sub>TPPAGT</sub> (T-959) des Thermolysinverdaus zu beobachten.

### 9.4 Diskussion

Beim relativen Quantifizieren der Phosphorylierung von mPER2 mit  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff unter Untersuchung des Einflusses der *Serine/threonine-protein phosphatase 2A* gibt es nach den beiden Versuchsreihen Indizien für eine Regulation der Phosphorylierung am Threonin 959 von mPER2. Die entsprechenden Faktoren sind in den Tabellen der Versuche rot gekennzeichnet. Die mit der quantitativen Methode gemessene relative Änderung in der Phosphorylierung des Threonins 959 ist jedoch mit einem Faktor von ca. 1,4 relativ gering. Daher sind molekularbiologische Folgeversuche notwendig, um einen Einfluss der Phosphatase auf diese Phosphorylierungsstelle zu validieren, zum Beispiel durch Substitution des Threonins in der Aminosäuresequenz.

Problematisch am Quantifizieren mit  $^{15}\text{N}$ -Labeling waren auch die relativ geringen Mengen an Protein in beiden Versuchen. In der zweiten Versuchsreihe kam es zudem bei der Immunopräzipitation zu einer Koanreicherung von anderen Proteinen, welche die mPER2 Bande teilweise überlagerten. Dementsprechend wurden auch Phosphopeptide dieser Proteine über  $\text{TiO}_2$  mitangereichert. Da das Labeling mit  $^{15}\text{N}$ -Aminosäuren zudem relativ teuer ist, würden größere Ansätze der Versuche die Kosten für entsprechende Experimente stark erhöhen. Das säurekatalysierte Labeling mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff, welches in Kapitel 10 beschrieben ist, würde zu einem späteren Zeitpunkt der Probenaufbereitung erfolgen und wäre folglich in Bezug auf die Quantifizierung weniger exakt. Dafür wäre diese Methode erheblich kostengünstiger als das metabolische  $^{15}\text{N}$ -Labeling. Dies würde ein größeres Screening der Kinasen und Phosphatasen bezüglich ihres Einflusses auf bestimmte Phosphorylierungsstellen der Period-Proteine ermöglichen.

# 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling

## 10.1 Einleitung

### 10.1.1 Proteasekatalysiertes $^{18}\text{O}$ -Labeling

Die Isotopenmarkierung von Peptiden mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff wird bislang meist mittels einer enzymatischen Katalyse durchgeführt, wobei verschiedene Enzyme zum Einsatz kommen können. So ist zum Beispiel ein esterasekatalysierter Austausch (Bender und Kemp, 1957), ein phosphatasekatalysierter Austausch (Murphy und Clay, 1990) oder ein Austausch während der proteasekatalysierten Hydrolyse der Peptidbindung (Sharon et al., 1962) möglich. Dabei interagieren unterschiedliche Proteasen in verschiedener Weise mit der Amidbindung bzw. der neu entstandenen C-terminalen Carboxygruppe. So führen Proteasen, die ausschließlich mit der Amidbindung interagieren nur zum Austausch eines Sauerstoffatoms. Der proteolytische Verdau eines Proteins mit Chymotrypsin und Asp-N resultiert daher nur im Austausch eines  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffs, wobei dies beim Chymotrypsin nur beim einstufigen  $^{18}\text{O}$ -Labeling während der Proteolyse zutrifft, siehe Yao et al. (2003). Andere Proteasen interagieren auch mit der freien C-terminalen Carboxygruppe, sodass deren beide Sauerstoffatome ausgetauscht werden. Auf diese Weise können sowohl bei der proteolytischen Spaltung durch Trypsin, als auch bei der Spaltung durch Lys-C und Glu-C beide Sauerstoffatome der Carboxygruppe isotopenmarkiert werden (Schnolzer et al., 1996). Diese Methode der Isotopenmarkierung mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff kann zur Identifizierung des C-Terminus eines Proteins angewandt (Rose et al., 1983). Schnolzer et al. (1996) zeigten erstmalig die Anwendung von  $^{18}\text{O}$ -Labeling von Peptiden nach Proteaseverdau für deren relative Quantifizierung.

Die  $^{18}\text{O}$ -Isotopenmarkierung der Carboxygruppen ist relativ stabil gegenüber chemischen Einflüssen. Es ergibt sich z.B. keine Änderung der Isotopenmarkierung bei 5 % FA 4 °C über 24 Stunden (Stewart et al., 2001). Erst bei Zugabe von 2–3 % TFA bei gleichen Bedingungen findet ein Sauerstoffaustausch statt, der auch die Carboxygruppen an Glutaminsäure und Asparaginsäure betrifft (Stewart et al., 2001). Das  $^{18}\text{O}$ -Labeling wird ähnlich wie ICAT für das Labeling auf Peptidebene für quantitative Proteomanalytik verwendet (Fenselau et al., 2001). Die Forschung der letzten Jahre konzentrierte sich vor allem darauf, die Methode des Labelings effektiver und den Arbeitsablauf robuster und weniger zeitaufwendig zu gestalten.

Um die Effizienz der Isotopenmarkierung zu erhöhen, erfolgt das Labeling der Peptide nach dem tryptischen Verdau in einem separaten Labeling-Schritt, in dem der Probe erneut eine höhere Menge an Trypsin zugegeben und sie bei 30 °C über Nacht inkubiert

wird (Heller et al., 2003). Da das Trypsin seine Aktivität nach dem Labeling behält, kann ein Verlust der Isotopenmarkierung auftreten, wenn sich die Probe wieder in Wasser ohne Anreicherung von  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  befindet. Um dies zu verhindern, wird das Trypsin entweder durch Einfrieren bei  $-30^\circ\text{C}$  (Heller et al., 2003), durch Kochen des Ansatzes für 10 Minuten (Petritis et al., 2009) oder durch Alkylierung nach der Reaktion inaktiviert (Gevaert et al., 2004).

Bei anderen Ansätzen wird immobilisierte Protease für den Verdau bzw. das Labeling benutzt (Sevinsky et al., 2007). Ansätze mit z.B. immobilisiertem Trypsin eignen sich allerdings wegen unspezifischer Bindungen nicht für kleine Mengen biologischer Proben, bei denen die Proteinmenge im niedrigen Mikrogrammbereich liegt (Petritis et al., 2009).

Bei der enzymkatalysierten Isotopenmarkierung mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff weisen die Precursorionen zwischen leichter und schwerer Probe durch den Einbau von maximal zwei schweren Sauerstoffatomen einen maximalen Massenunterschied von 4 Da auf. Bei höher geladenen Peptiden können sich daher durch diese relativ geringe Massendifferenz überlappende Isotopenmuster zwischen leichter und schwerer Probe ergeben. Durch Quantifizierung auf MS/MS-Ebene wird versucht, diese Problematik abzumildern (White et al., 2009).

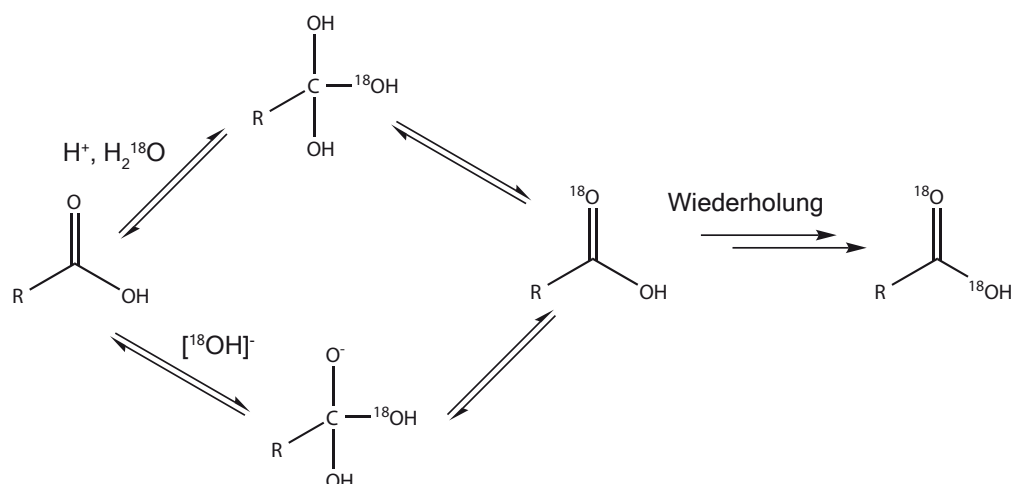
Als Software zur Berechnung der Verhältnisse zwischen schwerer und leichter Probe und zum Dekonvolvieren der Isotopenmuster beim Labeling mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff kann z.B. die Mascot Distiller *Quantitation Toolbox* (Matrix Science Ltd., London, UK) zum Einsatz kommen. Einen Überblick über das Thema enzymkatalysiertes  $^{18}\text{O}$ -Labeling zeigen die Reviews von Capelo et al. (2010) und Miyagi und Rao (2007).

### 10.1.2 Säurekatalysiertes $^{18}\text{O}$ -Labeling

Alternativ zum enzymkatalysierten Labeling von Carboxygruppen ist auch ein säure- oder basenkatalysierter Ansatz der  $^{18}\text{O}$ -Isotopenmarkierung von Carboxygruppen möglich. Der Ansatz zur Isotopenmarkierung von Carboxygruppen mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff wurde an Aminosäuren zuerst durch Mears und Sobotka (1939) gezeigt. Hierbei wurde die getrocknete Aminosäure in  $^{18}\text{O}$ -Wasser gelöst und über einen längeren Zeitraum aufgekocht. Murphy und Clay (1979) verwendeten durch Säurekatalyse isotopenmarkierte Aminosäuren als interne Standards für die gaschromatographische Analyse in Kombination mit Massenspektrometrie. Bei dieser Methode wurden die Aminosäuren mit HCl in  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  für mehrere Tage auf  $60\text{--}70^\circ\text{C}$  erhitzt. Der Mechanismus der Reaktion ist in Abbildung 10.1 auf Seite 143 dargestellt.

Kürzlich wurde die Möglichkeit der säurekatalysierten  $^{18}\text{O}$ -Isotopenmarkierung für das Labeling von Peptiden bei proteomischen Anwendungen durch Niles et al. (2009) untersucht. Dabei wurden die zu markierenden Peptide mit 1 % TFA in Wasser mit 50 %  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  versetzt, bis nach 11 Tagen bei Raumtemperatur das Equilibrium erreicht war. Neben dem C-Terminus werden so auch die Carboxygruppen von Glutaminsäure und Asparaginsäure isotopenmarkiert, wobei der Austausch an der Asparaginsäure am langsamsten abläuft (Niles et al., 2009). Ein anderer Ansatz für das säurekatalysierte  $^{18}\text{O}$ -Labeling wurde von Liu et al. (2010) vorgestellt. Die Proteine wurden direkt mit 2,5 % FA in Wasser mit 50 %  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  und 20 mM DDT versetzt und für 15 Minuten in





**Abbildung 10.1** – Mechanismus des säure- und basenkatalysierten  $^{18}\text{O}$ -Labelings nach Murphy und Clay (1990)

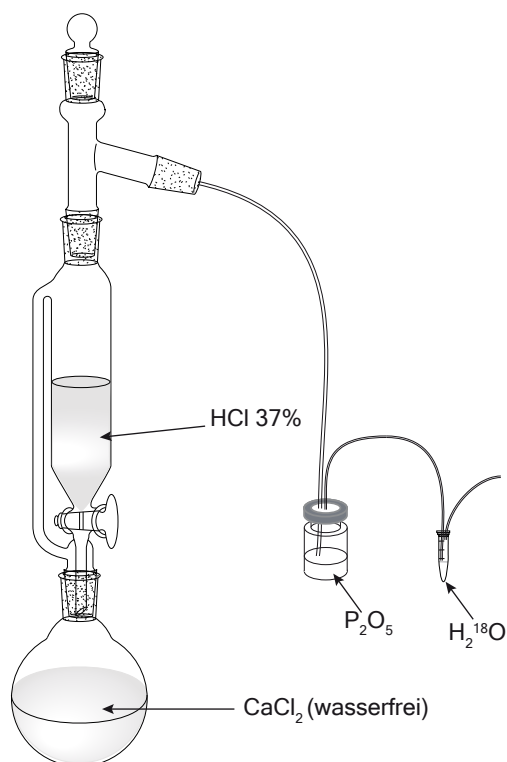
der Mikrowelle erhitzt. Die Proteine werden bei dieser Methode säurekatalysiert partiell hydrolysiert und gleichzeitig an den Carboxygruppen isotopenmarkiert.

## 10.2 Material und Methoden

Für die Experimente zur Isotopenmarkierung mittels  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff wurde Cer(IV)-Ammoniumnitrat von Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Bismuth-Triflat, Phosphorpentoxid, wasserfreies Calciumchlorid, konzentrierte Trifluormethansäure und konzentrierte Trifluormethylsulfonsäure stammten von Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Es kam weiterhin 37 % Salzsäure der Firma Carl Roth (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zum Einsatz. Außerdem wurde isotopenmarkiertes Wasser in den Reinheitsgraden 97 %  $^{18}\text{O}$  der Firma Euroisotope SAS (Saint-Aubin Cedex, Frankreich) und 99 %  $^{18}\text{O}$  von Sigma-Aldrich verwendet.

Die konzentrierte Salzsäure in  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  wurde vor Ort mittels der Apparatur in Abbildung 10.2 auf Seite 144 hergestellt. Dazu wurde 37 % Salzsäure auf wasserfreies Calcium-Chlorid getropft, wodurch Chlorwasserstoffgas entstand, welches durch das Leiten über Phosphorpentoxid getrocknet wurde. Dieses Chlorwasserstoffgas wurde dann durch 100  $\mu\text{l}$   $^{18}\text{O}$ -Wasser geleitet. Dieser Vorgang wurde für 3 Stunden durchgeführt um sicherzustellen, dass die Salzsäurelösung gesättigt war.

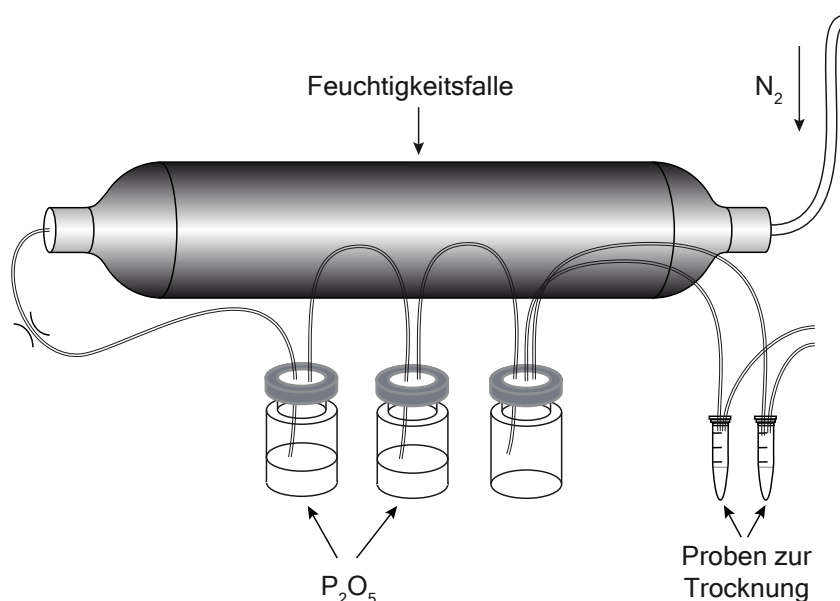
Die Reaktionen erfolgten in 0,2 ml Reaktionsgefäßen der Firma Carl Roth. Die Proben wurden während der Reaktion auf einem Thermomix Comfort der Firma Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) temperiert. Das Trocknen der Proben erfolgte in Vakuumkonzentratoren (Concentrator 5301) der Firma Eppendorf bei niedrigster Temperatureinstellung ( $<30^\circ\text{C}$ ) und von Thermo Scientific (Savant SPD121P SpeedVac<sup>®</sup>) bei Raumtemperatur. Für die Gefriertrocknung wurde ein Lyophilisator Modell Alpha 2-4 von Christ (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz,



**Abbildung 10.2** – Apparatur zur Herstellung der schweren konzentrierten HCl: konzentrierte Salzsäure wird auf wasserfreies  $\text{CaCl}_2$  getropft, welches das Wasser bindet. Dadurch wird Chlorwasserstoffgas frei, welches über Phosphopentoxid getrocknet wird. Das getrocknete Gas wird durch  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  geleitet, wodurch Salzsäure mit schwerem  $^{18}\text{O}$ -Wasser entsteht.

Deutschland) eingesetzt. Nach der Reaktion wurden die Proben entweder im Vakuumkonzentrator oder bei der Verwendung von Salzsäure zur Säurekatalyse unter trockenem Stickstoff getrocknet. Der Aufbau der Apparatur zum Trocknen des Stickstoffs war wie in Abbildung 10.3 auf Seite 145 abgebildet. Stickstoff aus dem Haustank wurde zuerst durch eine „*Big moisture trap*“ Model 23991 von Supelco (Sigma-Aldrich) geleitet, um im Stickstoff enthaltenes Wasser zu binden. Anschließend wurden verbleibende Spuren von Wasser durch zweimaliges Leiten über Phosphopentoxid entfernt. Der getrocknete Stickstoff wurde über die Probe geleitet, um so die wässrige Salzsäure zu entfernen.

Sämtliche Proben der Versuchsreihe wurden am Q-TOF gemessen. Als Testpeptide wurden 50 pmol Glu-Fib und die Aqua-Peptide RAPSPPLFQSR und RApSPPLFQSR zu je 1,5 pmol eingesetzt. Als Peptidmischung kamen 400 fmol des Peptide Mix von Dionex zum Einsatz, als Testprotein wurde 20 pmol PKA verwendet.



**Abbildung 10.3** – Apparatur zum Entfernen der HCl nach Ende der Reaktion: Stickstoffgas wird über eine „*Big moisture trap*“ von Supelco und zweimal über Phosphopentoxid getrocknet und anschließend über den Probenansatz geleitet. Das Stickstoffgas entfernt dabei schonend innerhalb von 30 Minuten die Salzsäure aus der Probe.

## 10.3 Ergebnisse

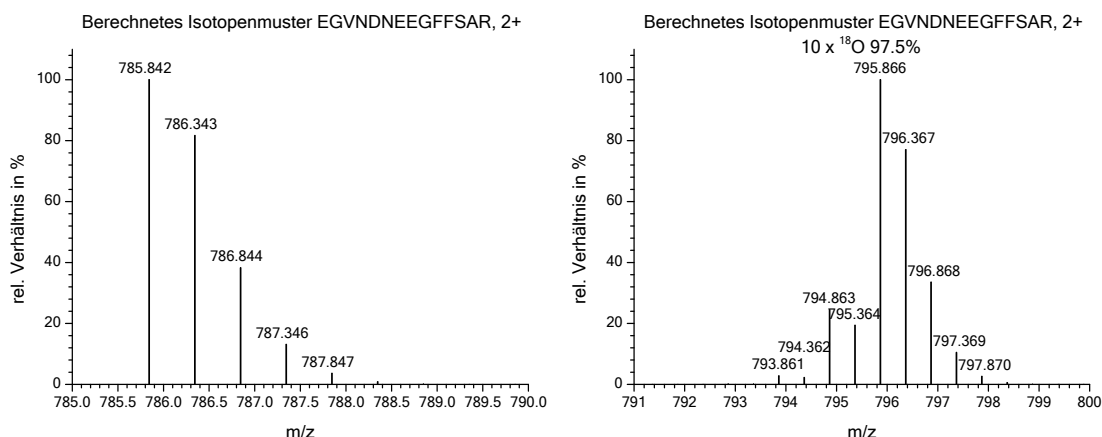
### 10.3.1 Optimierung der Labelingmethode an Peptiden

Die Isotopenmarkierung der Carboxygruppen wurde von uns im Experiment zunächst bei einem Versuch mit Cer(IV)-Ammoniumnitrat und  $^{18}\text{O}$ -Wasser beobachtet, der im Rahmen der Desphosphorylierungsexperimente im Abschnitt 8.3.10 durchgeführt wurde. Da das Labeling bei diesem Versuch bei weitem nicht vollständig war, wurden die Reaktionsbedingungen variiert, um eine möglichst vollständige Isotopenmarkierung zu erreichen. Da die Lewis-Säuren Cer(IV)-Ammoniumnitrat und Bismuth-Triflat aus dem Reaktionsansatz nur durch Aufreinigungsschritte wie z.B. über Reversed-Phase Stage Tips zu entfernen sind, wurden die nächsten Experimente mit verschiedenen flüchtigen organischen Säuren durchgeführt. Zunächst wurden dafür die Reaktionsbedingungen ähnlich wie bei Liu et al. (2010) gewählt.

#### Labeling mit organischen Säuren

Als Testpeptid wurde Glu-Fib (Sequenz siehe Tabelle 1 auf Seite 222) gewählt, da es neben der Carboxygruppe am C-Terminus vier weitere Carboxygruppen an drei Glutaminsäureseitenketten und einer Asparaginsäureseitenkette besitzt. Daher stellt es einen relativ anspruchsvollen Peptid für ein vollständiges Labeling dar, da so insgesamt 10 Sau-

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling

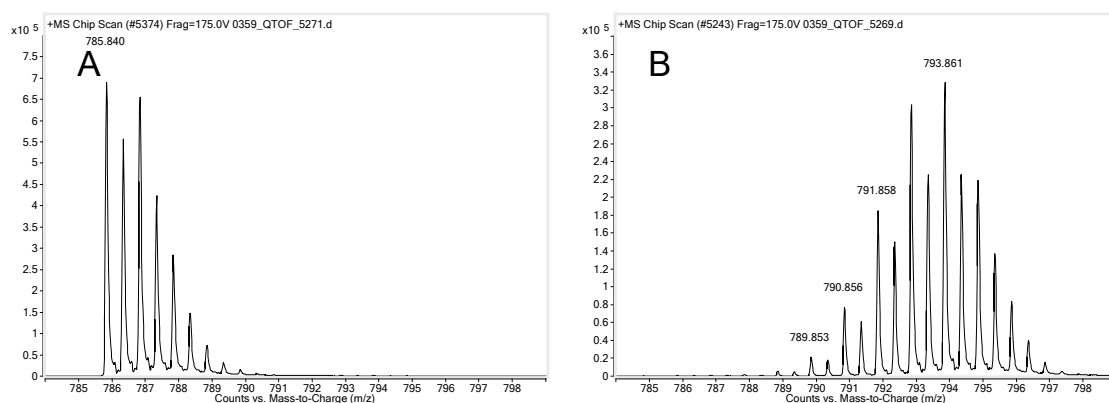


**Abbildung 10.4** – Theoretische Isotopenmuster von Glu-Fib EGVNDNEEGFFSAR, 2+ ungelabelt und nach  $^{18}\text{O}$ -Labeling bei einer Einbaurate des  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffes von 97,5 %

erstoffatome ausgetauscht werden müssen. In Abbildung 10.4 auf Seite 146 sind die Isotopenmuster abgebildet, welche Glu-Fib im ungelabelten Zustand und bei vollständigem Labeling mit 97,5%igem  $^{18}\text{O}$ -Wasser zeigen. Da das Erhitzen in der Mikrowelle (Serverin Haushaltsmikrowelle mit 750 W Leistung) keine sichtbaren Vorteile gegenüber dem Erhitzen der Proben im Thermoblock zeigte, wurden die Proben zunächst für 30 Minuten bei 70 °C in Thermoblock erhitzt. Anschließend wurden die Proben im Vakuum getrocknet, in 20 µl 150 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3(\text{aq})$  gelöst und mit dem Q-TOF gemessen.

Wie in Abbildung 10.5 auf Seite 147 zu sehen ist, ist die Einbaurate der Isotopenmarkierung bei diesen Bedingungen gering. Trifluoressigsäure (Spektrum B) scheint dabei aufgrund der höheren Acidität die Reaktion besser zu katalysieren als Ameisensäure (Spektrum A). Somit wurde in der nächsten Versuchsreihe getestet, ob man mit steigenden Konzentrationen an Säure und längerer Reaktionsdauer das Labeling weiter verbessern kann. Für den nächsten Ansatz wurde daher Trifluoressigsäure in den Volumenkonzentrationen (v/v) von 5 %, 10 %, 20 % und 50 % eingesetzt und die Reaktionsdauer von 30 Minuten auf eine Stunde erhöht. Wie in Abbildung 10.6 auf Seite 148 ersichtlich ist, erhöht sich die Qualität des Labelings zuerst mit steigender Säurekonzentration, um bei einer Säurekonzentration von 10 % ein Maximum zu erreichen. Bei weiter steigender Säurekonzentration fällt der Anteil des ins Peptid integrierten  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffs wieder ab. Ursächlich ist dabei vermutlich die eingesetzte Säure. Sie besitzt eine Carboxyfunktion mit  $^{16}\text{O}$ -Sauerstoffen, welche durch die säurekatalysierte Reaktion ebenfalls durch Sauerstoffe des  $^{18}\text{O}$ -Wassers substituiert werden. Auf diese Weise steigt der Anteil an  $^{16}\text{O}$ -Wasser im Reaktionsansatz, wodurch das Labeling verschlechtert wird.

Des Weiteren ist in Abbildung 10.7 auf Seite 149 in den verschiedenen Base-Peak-Chromatogrammen zu beobachten, dass durch die steigende Säurekonzentration bei den gewählten Reaktionsbedingungen die Anzahl der unerwünschten Nebenprodukte z.B. durch Hydrolyse und Desamidierung stark zunimmt. Diese Nebenreaktionen sind für



- A | 5 % (v/v) FA 97 % H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 97 % 70 °C 30 min  
 B | 5 % (v/v) TFA 97 % H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 97 % 70 °C 30 min

**Abbildung 10.5** – <sup>18</sup>O-Labeling von Glu-Fib mit FA und TFA; bei gleicher Temperatur und Reaktionsdauer erfolgt bei der Katalyse mit Trifluoressigsäure ein wesentlich stärkerer Austausch der <sup>18</sup>O-Sauerstoffatome als bei der Katalyse mit Ameisensäure.

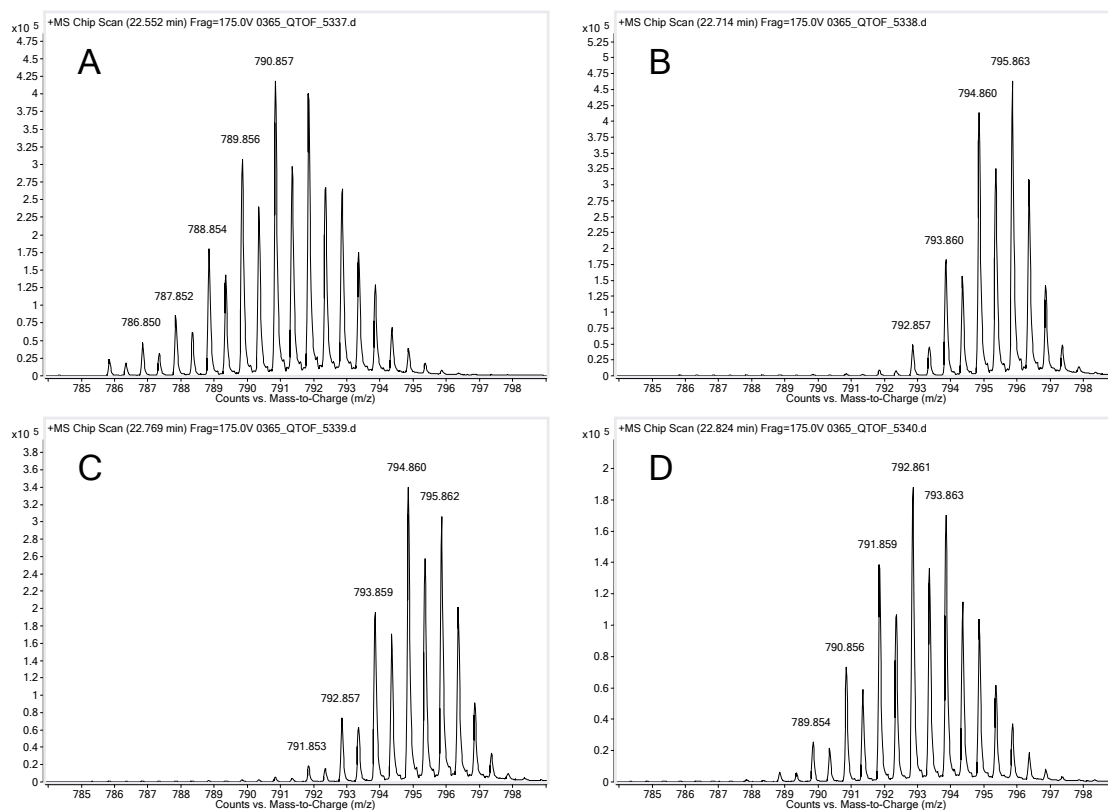
das Quantifizieren nachteilig, da sich die Signalintensität eines Peptidpeaks auf viele verschiedene Nebenprodukte verteilt und damit deutlich sinkt. Es wurde daher versucht die Reaktionsbedingungen weniger harsch zu gestalten, indem die Reaktionstemperatur gesenkt wurde und die Reaktion dafür über einen längeren Zeitraum durchgeführt wurde. Die Reaktion wurde dann mit je 5 % und 10 % (v/v) Trifluoressigsäure und Trifluormethansulfonsäure (TFMS) durchgeführt. Die Temperatur des Ansatzes lag bei 15 °C und die Reaktion wurde über Nacht durchgeführt. Der Grad der Isotopenmarkierung bei diesen Bedingungen war beim Ansatz mit 10 % (v/v) Trifluoressigsäure vergleichbar mit dem des Labelings mit 5 % (v/v) Trifluoressigsäure bei 70 °C und 30 Minuten Reaktionsdauer. In Bezug auf die Nebenprodukte wurde die gesenkte Reaktionstemperatur allerdings durch die erhöhte Säurekonzentration und die längere Reaktionsdauer ausgeglichen, so dass ähnlich viele Nebenprodukte zu beobachten waren. Die Einbaurate der Isotopenmarkierung war bei den Ansätzen mit 5 % and 10 % (v/v) TFMS geringer als bei der Verwendung von TFA, was vermutlich an der höheren Anzahl an <sup>16</sup>O-Sauerstoffatomen der TFMS liegt.

Um die Qualität zu verbessern, lag die Überlegung nahe, zuerst die verwendete Säure mit H<sub>2</sub><sup>18</sup>O zu versetzen, um die Anzahl schwerer Sauerstoffatome in der Säure zu erhöhen. Es wäre dann jedoch notwendig gewesen die Säure nach diesem Schritt vom Wasser zu trennen, welches in Folge einen geringeren Anteil von H<sub>2</sub><sup>18</sup>O enthalten hätte.

### Labeling mit Mineralsäuren

Um den Austausch von <sup>18</sup>O-Sauerstoff mit der Säure zu verhindern, wurden in den folgenden Versuchen Mineralsäuren verwendet, welche keine Sauerstoffatome enthalten. Es

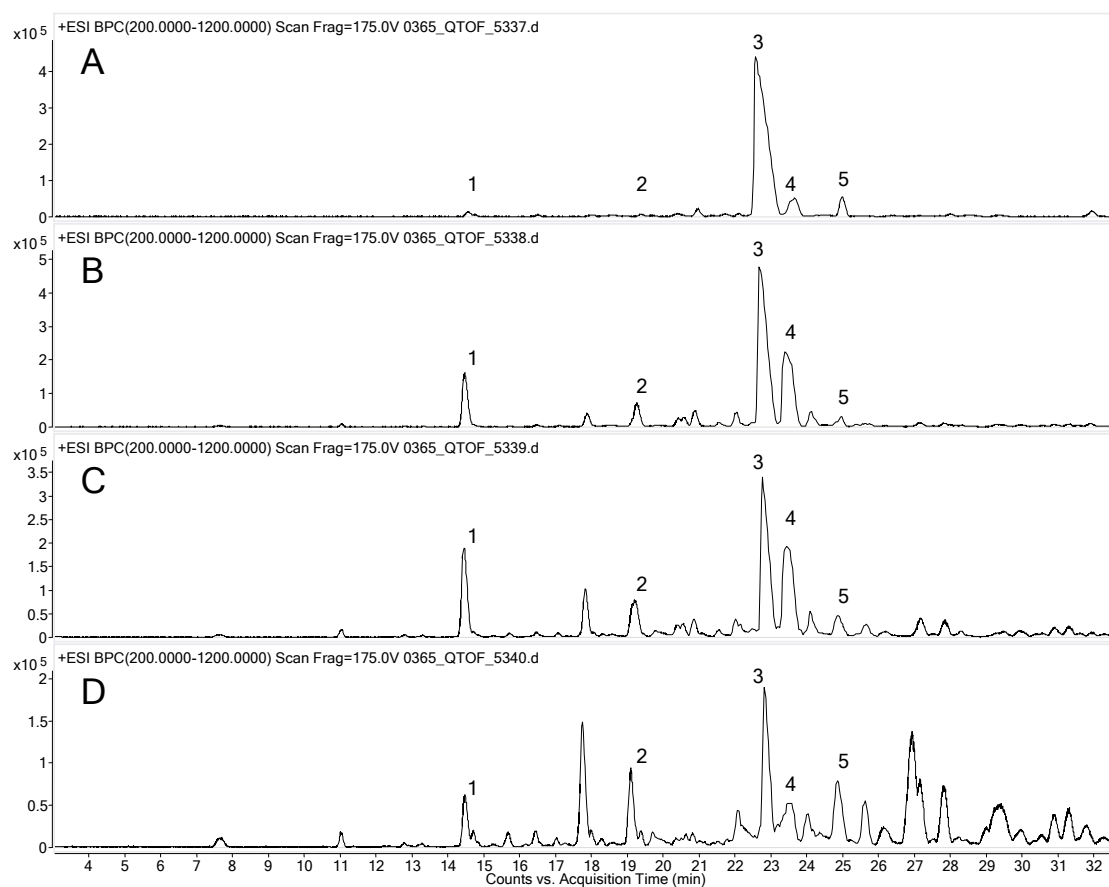
## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling



A	5 % (v/v) TFA $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 97 % 70 °C 60 min
B	10 % (v/v) TFA $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 97 % 70 °C 60 min
C	20 % (v/v) TFA $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 97 % 70 °C 60 min
D	50 % (v/v) TFA $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 97 % 70 °C 60 min

**Abbildung 10.6** –  $^{18}\text{O}$ -Labeling von Glu-Fib mit 5–10 % (v/v) TFA; der Grad an eingebautem  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff nimmt bis zu 10 % (v/v) TFA zu und mit steigender TFA-Konzentration wieder ab.

wurde daher Chlorwasserstoffsäure, Bromwasserstoffsäure und Iodwasserstoffsäure für die säurekatalysierte Isotopenmarkierung verwendet. Die Säuren wurden jeweils auf wasserfreies Calciumchlorid getropft um das entsprechende Halogenwasserstoffgas freizusetzen. Dieses wurde anschließend in das  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Wasser geleitet um das Gas im  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Wasser zu lösen. Es wurde untersucht, ob die unterschiedliche Säurestärke das Verhältnis von Markierungsgrad und Nebenprodukten beeinflusst. Hierbei konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden. Daher wurde für die weiteren Versuche die häufig verwendete Chlorwasserstoffsäure verwendet. Um die Reproduzierbarkeit der Herstellung zu erhöhen, wurde das Chlorwasserstoffgas wie in Abbildung 10.2 auf Seite 144 gezeigt generiert. Das hergestellte Chlorwasserstoffgas wurde über Phosphopentoxid getrocknet, um eine Verschleppung von Wasser  $^{16}\text{O}$ -Sauerstoff zu vermindern. Für die weiteren Experimente



A	5 % (v/v)	TFA $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 97 % 70 °C 60 min
B	10 % (v/v)	TFA $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 97 % 70 °C 60 min
C	20 % (v/v)	TFA $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 97 % 70 °C 60 min
D	50 % (v/v)	TFA $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 97 % 70 °C 60 min

1	FFSAR, 2+
2	GFFSAR, 2+
3	EGVNDNEEGFFSAR, 2+
4	EGVNDNEEGFFSAR, 2+, 1×desamidiert
5	EGVNDNEEGFFSAR, 2+, Glu->pyro-Glu

**Abbildung 10.7** – Base-Peak-Chromatogramme des  $^{18}\text{O}$  Labelings von Glu-Fib mit 5–20 % (v/v) TFA; es ist zu erkennen, dass mit steigender Säurekonzentration die hydrolytischen Spaltprodukte stark zunehmen.

wurde eine Temperatur von  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  und eine Reaktionsdauer über Nacht gewählt. Es zeigte sich jedoch, dass eine Reaktionsdauer von 5 Stunden und 30 Minuten bei dieser Temperatur ausreichend war. Für die neuen Experimente wurde Wasser mit einem Anteil von 99 %  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  eingesetzt. Die Probe wurde nach der Isotopenmarkierung in der Speedvac getrocknet und vor der Messung in 0,1 % FA aufgenommen. Bei den Versuchen mit den genannten Bedingungen zeigten sich noch relativ viele Nebenprodukte und Schwankungen in der Rate der Isotopenmarkierung. Daher waren weitere Schritte notwendig um die Methode zur Isotopenmarkierung zu optimieren.

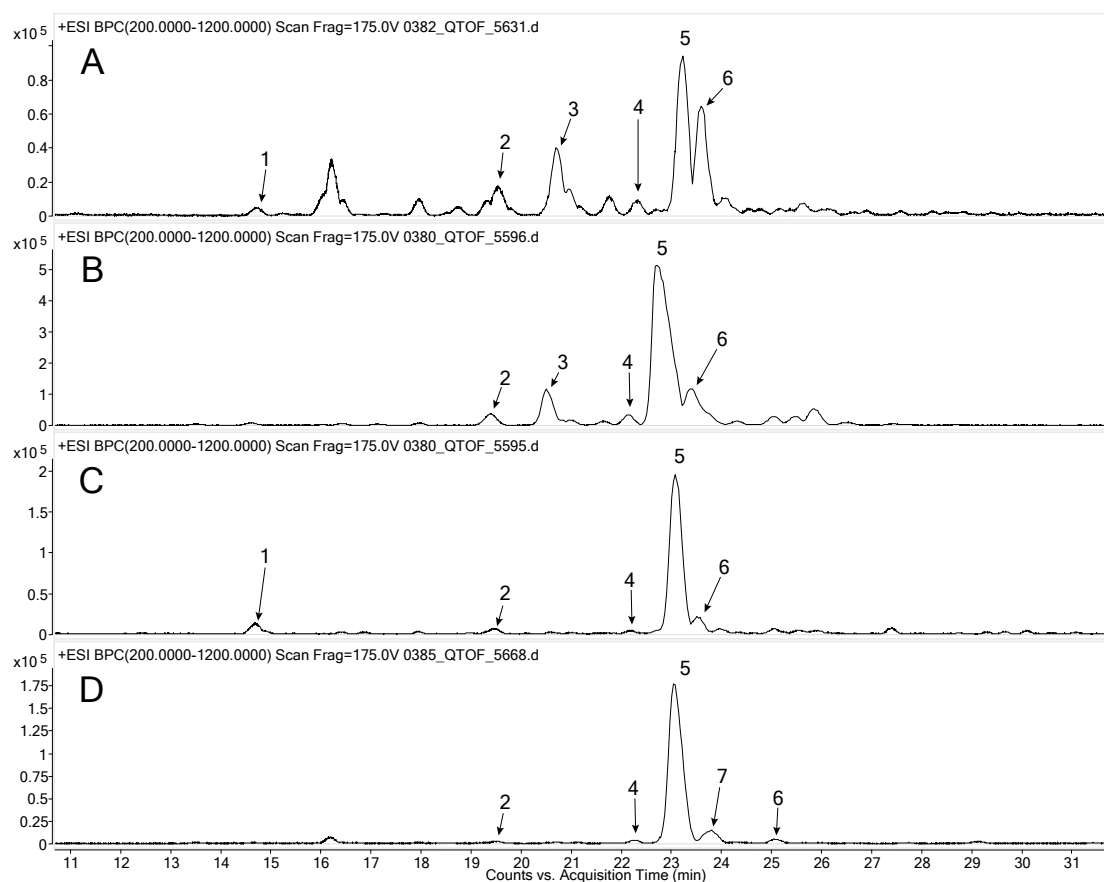
### Optimierung der Methode zum Entfernen der Salzsäure

Aus weiteren Versuchen ergab sich, dass der kritische Schritt für die Einbaurate des schweren Isotops bei der Isotopenmarkierung das Entfernen der Salzsäure nach der Reaktion ist. In Abbildung 10.8 auf Seite 151 sind die Base-Peak-Chromatogramme von Glu-Fib für verschiedene Methoden zum Entfernen und Neutralisieren der Salzsäure gezeigt. Es ist zu erkennen, dass bei der Entfernung der Säure im Vakuum in den Speedvacs relativ viele Spaltungen und Nebenreaktionen auftreten: (A und B). Das Neutralisieren der Salzsäure mit konzentrierter Ammoniumhydrogencarbonatlösung (C) und das Entfernen der Salzsäure im Lyophilisator (D) sind hingegen in Bezug auf Peptidhydrolyse und Nebenreaktionen relativ schonend. Es zeigte sich außerdem, dass bei den unterschiedlichen Methoden zum Entfernen der Salzsäure auch die Qualität der Isotopenmarkierung beeinflusst wurde, siehe Abbildung 10.9 auf Seite 152. Dies lässt sich vermutlich durch den Eintrag von leichtem Wasser aus der Umgebungsluft in die Probe erklären. Am besten schneidet hier das Neutralisieren der Salzsäure mit Ammoniumhydrogencarbonat (C) ab, einen relativ starken Verlust der Isotopenmarkierung gab es im Lyophilisator (D) und einen geringen Verlust der Isotopenmarkierung unter Vakuumtrocknung (A und B). Da das Neutralisieren mit Ammoniumhydrogencarbonat zu einer unerwünschten Erhöhung der Salzkonzentration in der Probe führt, welche zu Problemen bei der LC-MS-Analyse führen kann, wurde nach einer weiteren Möglichkeit zum Trocknen der Probe nach der Isotopenmarkierung gesucht.

Deshalb wurde das Trocknen der Probe mit Stickstoffgas getestet. Dabei wird Stickstoff über die Salzsäure geleitet, was zum Verdunsten dieser führt. Das Trocknen der Probe im Stickstoffstrom zeigte nur wenige Nebenreaktionen, es traten jedoch anfangs Schwankungen in der Qualität der Isotopenmarkierung auf. Diese wurden vermutlich durch Spuren von Wasser im Stickstoff aus dem Haustank verursacht. Zum Trocknen des Stickstoffs wurde daher eine Apparatur wie in Abbildung 10.3 auf Seite 145 gezeigt verwendet. Die Verwendung von wasserfreiem Stickstoff erwies sich als die optimale Methode, um die Salzsäure unter schonenden Bedingungen und unter Erhalt des  $^{18}\text{O}$ -Labels aus der Probe zu entfernen. Wie in Abbildung 10.10 auf Seite 153 zu sehen ist, ergab sich diesmal eine gute Effizienz der Isotopenmarkierung.

Der weitere Vergleich von unbehandeltem und behandeltem Glu-Fib, welches für 5 Stunden und 30 Minuten mit  $\text{HCl}$  in  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  versetzt wurde zeigte, dass nur wenige Nebenreaktionen auftraten. Interessanterweise war zu beobachten, dass die Desamidierung, welche bei der Katalyse mit TFA vermehrt auftrat, bei steigender Konzentration von  $\text{HCl}$



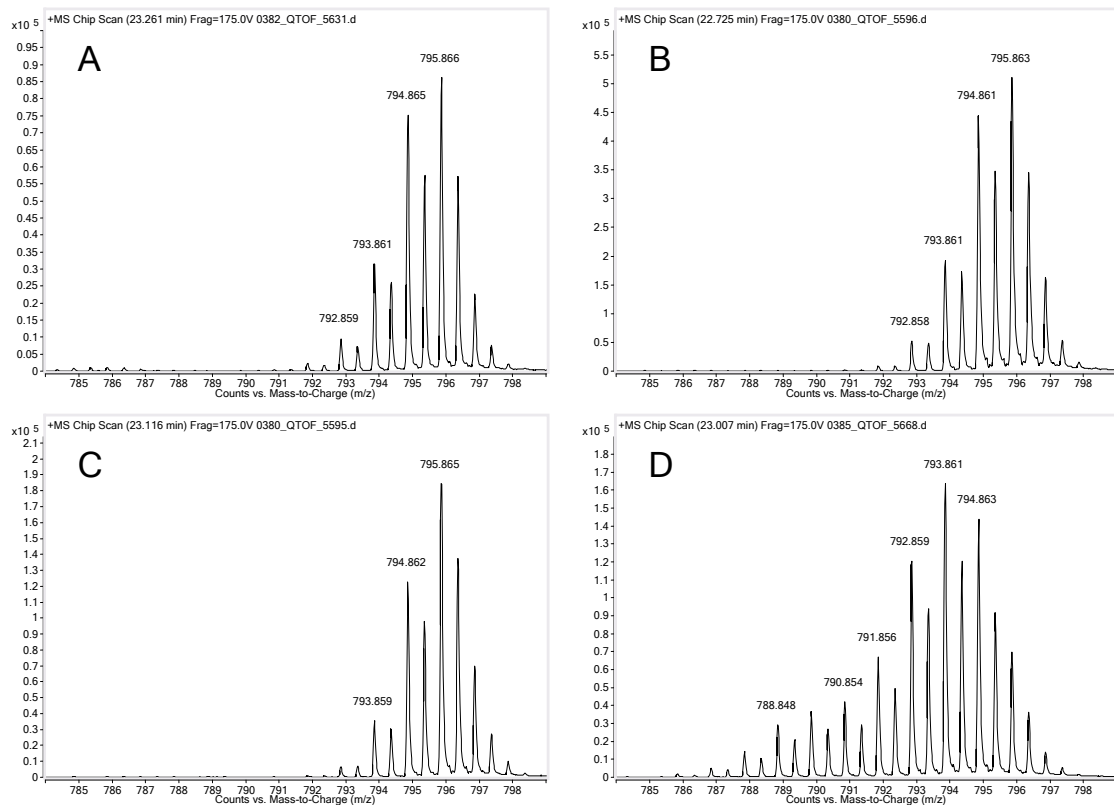


- |   |                                                    |
|---|----------------------------------------------------|
| A | Thermo Speedvac RT 1 h                             |
| B | Eppendorf Concentrator 30 min                      |
| C | konzentrierte Lösung von $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ |
| D | Lyophilisator über Nacht                           |

- |   |                                                    |
|---|----------------------------------------------------|
| 1 | FFSAR, 2+                                          |
| 2 | GFFSAR, 2+                                         |
| 3 | EGVNDNEEGFFSAR, 3+, + $^{18}\text{O}$ Phenylalanin |
| 4 | VNDNEEGFFSAR, 2+                                   |
| 5 | EGVNDNEEGFFSAR, 2+                                 |
| 6 | EGVNDNEEGFFSAR, 2+, Glu->pyro-Glu                  |
| 7 | EGVNDNEEGFFSAR, 2+, 1×desamidiert                  |

**Abbildung 10.8** – Base-Peak-Chromatogramme von Glu-Fib für verschiedene Methoden zum Entfernen der Salzsäure nach dem Labeling; beim Entfernen der Salzsäure in den Vakuumkonzentratoren (A und B) zeigen sich eine starke Deaminidierung und Hydrolyse des Peptids. Die Neutralisation der Säure mittels Ammoniumhydrogencarbonat (C) und die Gefriertrocknung (D) zeigen wesentlich weniger Nebenreaktionen.

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling

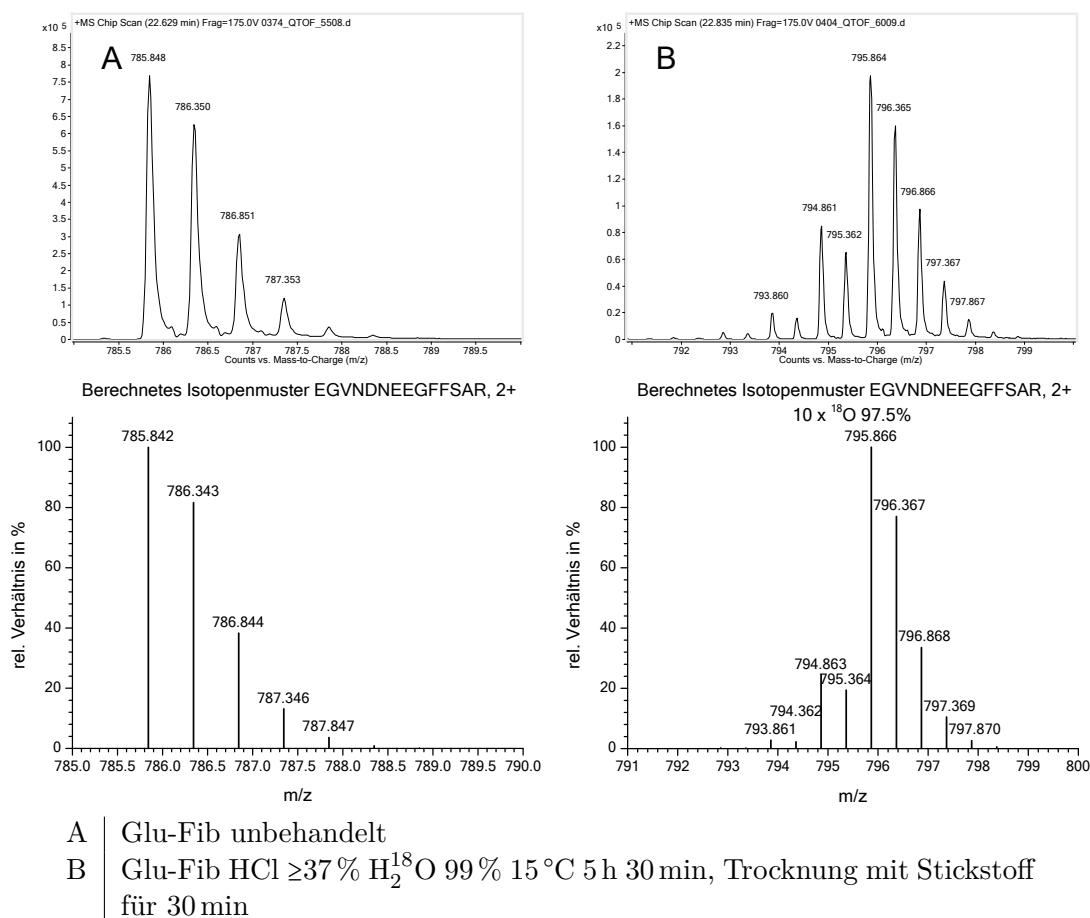


- A Thermo Speedvac RT 1 h
- B Eppendorf Concentrator 30 min
- C konzentrierte Lösung von  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$
- D Lyophilisator über Nacht

**Abbildung 10.9** – Einbaureate des  $^{18}\text{O}$ -Labels bei Glu-Fib nach Entfernen der Salzsäure durch verschiedene Methoden; in den Massenspektren ist zu erkennen, dass die Isotopenmarkierung beim Entfernen der Salzsäure durch Neutralisation mit Ammoniumhydrogencarbonat (C) die höchste Einbaureate aufweist, bei der Entfernung durch die Speedvac (A und B) ist die Einbaureate ebenfalls hoch, Gefriertrocknung (D) führt zu einem größeren Verlust der Isotopenmarkierung.

im Wasser unterdrückt wurde. Die Nebenprodukte der unbehandelten (Graph A) und der behandelten Glu-Fib-Probe (Graph B) sind in den Base-Peak-Chromatogrammen in Abbildung 10.11 auf Seite 154 zu sehen.

Der etablierte Arbeitsablauf mit einer hohen Reproduzierbarkeit, welcher in den folgenden Versuchen verwendet wurde, setzte sich somit aus folgenden Schritten zusammen: Zuerst wurde die Probe unter Vakuum vollständig getrocknet. Anschließend wurde die Probe im Thermomixer Compact für 15 Minuten bei  $15^\circ\text{C}$  temperiert und dann mit

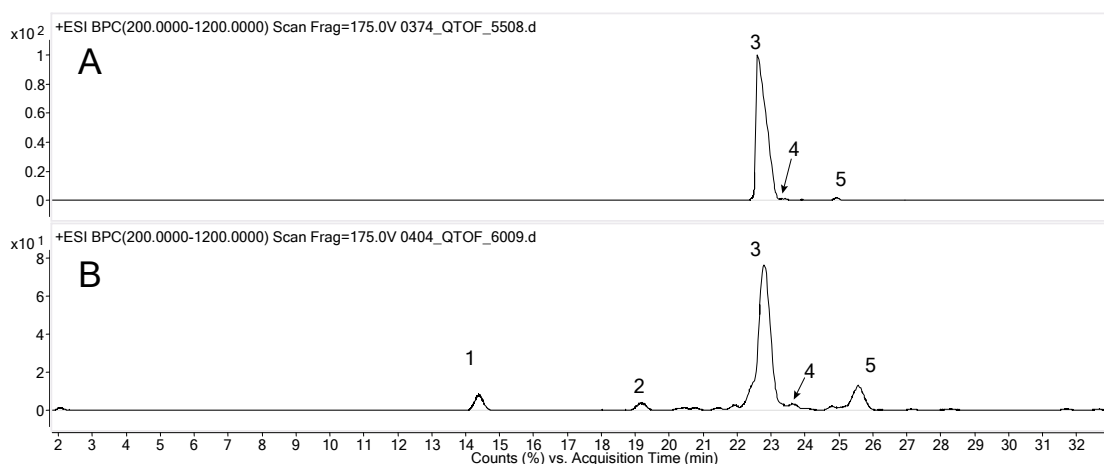


**Abbildung 10.10** – Gemessene und berechnete Isotopenmuster von Glu-Fib EGVNDNEEGFFSAR, 2+ unmarkiert (A) und mit  $^{18}\text{O}$ -Labeling in HCl (B). Bei der Isotopenmarkierung kommt es zum Austausch von 10 Sauerstoffatomen; die Einbaurrate des  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffes liegt bei ca. 97%.

Argon überschichtet, welches ebenfalls durch eine Supelco „*Big moisture trap*“ getrocknet worden war. Das Argon soll verhindern, dass Luft und damit auch Luftfeuchtigkeit während der Reaktion an die Probe gelangen und somit die Einbaurrate der Isotopenmarkierung verschlechtern könnte. Anschließend wurde die Probe mit 5  $\mu\text{l}$  der konzentrierten HCl in  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ , welche ebenfalls auf 15 °C temperiert war, versetzt. Die Reaktion wurde bei 15 °C für 5 Stunden und 30 Minuten durchgeführt und anschließend bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde unter trockenem Stickstoff getrocknet. Da bei diesem Trockenschritt noch geringe Mengen von HCl in der Probe verblieben, wurden anschließend 5  $\mu\text{l}$  einer konzentrierte Lösung von  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  zugegeben, um den pH-Wert zu neutralisieren. Die Probe wurde anschließend am Q-TOF gemessen.

In den  $\text{MS}^2$ -Spektren der unbehandelten und der  $^{18}\text{O}$ -isotopenmarkierten Probe von Glu-Fib in Abbildung 10.12 auf Seite 155 ist zu erkennen, dass die Isotopenmarkierung

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling



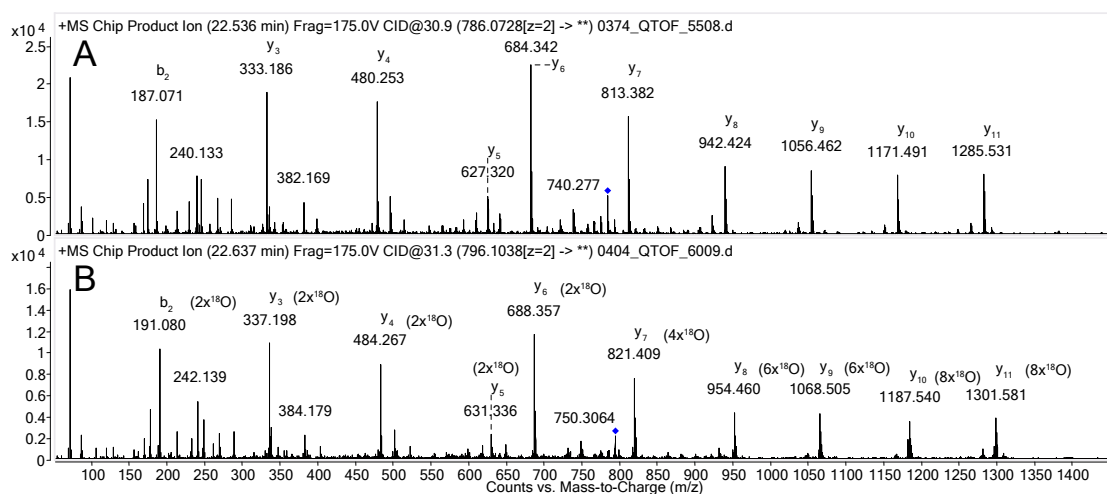
A	Glu-Fib unbehandelt
B	Glu-Fib HCl $\geq 37\%$ $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 99% 15 °C 5 h 30 min, Trocknung mit Stickstoff für 30 min
1	FFSAR, 2+
2	GFFSAR, 2+
3	EGVNDNEEGFFSAR, 2+
4	EGVNDNEEGFFSAR, 2+, 1×desamidiert
5	EGVNDNEEGFFSAR, 2+, Glu->pyro-Glu

**Abbildung 10.11** – Base-Peak-Chromatogramme von Glu-Fib EGVNDNEEGFFSAR, 2+ unmarkiert (A) und mit  $^{18}\text{O}$ -Labeling in HCl (B); bei der isotopenmarkierten Probe sind im Vergleich zur unmarkierten Probe nur relativ wenig Nebenprodukte zu beobachten.

mit je zwei ausgetauschten  $^{18}\text{O}$ -Atomen am C-Terminus und an den Seitenketten von Asparaginsäure und Glutaminsäure auftritt. Neben Glu-Fib wurden mit der beschriebenen Methode auch die Aqua-Peptide RAPSPPLFQSR und RApSPPLFQSR behandelt. Da bei RAPSPPLFQSR nur die Sauerstoffatome am C-Terminus ausgetauscht werden, ist zu beobachten, dass die Peaks von behandeltem und unbehandeltem Peptid im MS-Spektrum wesentlich näher zusammenliegen als bei Glu-Fib. Bei den beiden Aqua-Peptiden ließ sich ebenfalls eine gute Einbaurate der Isotopenmarkierung beobachten, siehe Abbildung 10.13 auf Seite 156.

### Untersuchung des Einflusses von $^{18}\text{O}$ -Labeling auf die Phosphorylierung

Für die Verwendbarkeit der Methode zum säurekatalysierten  $^{18}\text{O}$ -Labeling war von Interesse, inwiefern die Phosphorylierung z.B. an Serin durch die verwendeten Reaktionsbedingungen beeinflusst wird. Mögliche säurekatalysierte Reaktionen stellen dabei die Phosphoesterspaltung oder der Austausch von Sauerstoffatomen an der Phosphatgruppe dar. Wie in Abbildung 10.14 auf Seite 157 dargestellt ist, entspricht das gemessene Isoto-



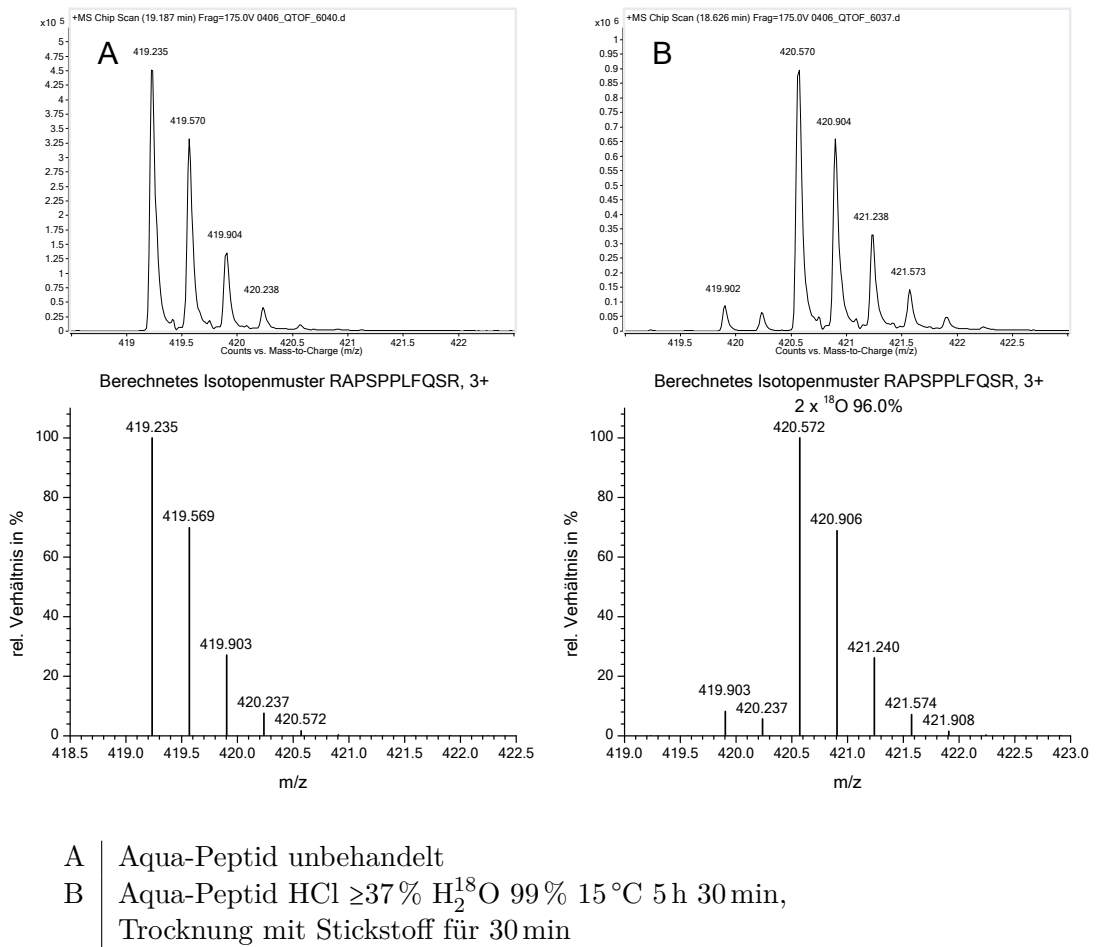
A | Glu-Fib unbehandelt

B | Glu-Fib HCl  $\geq 37\%$   $\text{H}_2^{18}\text{O}$  99 % 15 °C 5 h 30 min, Trocknung mit Stickstoff für 30 min

Glu-Fib unbehandelt A					Glu-Fib $^{18}\text{O}$ -Label B				
	$b^{1+}$	Sequenz	$y^{1+}$			$b^{1+}$	Sequenz	$y^{1+}$	
1	130,0499	E	1441,6342	14	1	134,0584	E	1457,6682	14
2	187,0713	G	1384,6128	13	2	191,0798	G	1400,6467	13
3	286,1397	V	1285,5444	12	3	290,1482	V	1187,5354	12
4	400,1827	N	1171,5014	11	4	404,1912	N	1068,5000	11
5	515,2096	D	1056,4745	10	5	523,2266	D	954,4570	10
6	629,2525	N	942,4316	9	6	637,2695	N	821,4060	9
7	758,2951	E	813,3890	8	7	770,3206	E	688,3549	8
8	887,3377	E	684,3464	7	8	903,3717	E	631,3334	7
9	944,3592	G	627,3249	6	9	960,3932	G	484,2650	6
10	1091,4276	F	480,2565	5	10	1107,4616	F	337,1966	5
11	1238,4960	F	333,1881	4	11	1254,5300	F	250,1646	4
12	1325,5281	S	246,1561	3	12	1341,5620	S	179,1274	3
13	1396,5652	A	175,1190	2	13	1412,5991	A		2
14		R		1	14		R		1

**Abbildung 10.12** – Fragmentspektren von Glu-Fib unmarkiert und mit  $^{18}\text{O}$ -Labeling; an den Fragmentspektren des unmarkierten (A) und des isotoopenmarkierten (B) Peptids ist zu erkennen, dass die Isotoopenmarkierung am C-Terminus des Peptids und an den Carboxygruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure stattfindet. Die Fragmentierung des Peptids wird durch das Labeling nicht beeinflusst. Bei beiden Spektren finden sich daher auch die einander entsprechenden b- und y-Ionen. Diese sind in der Tabelle jeweils rot markiert.

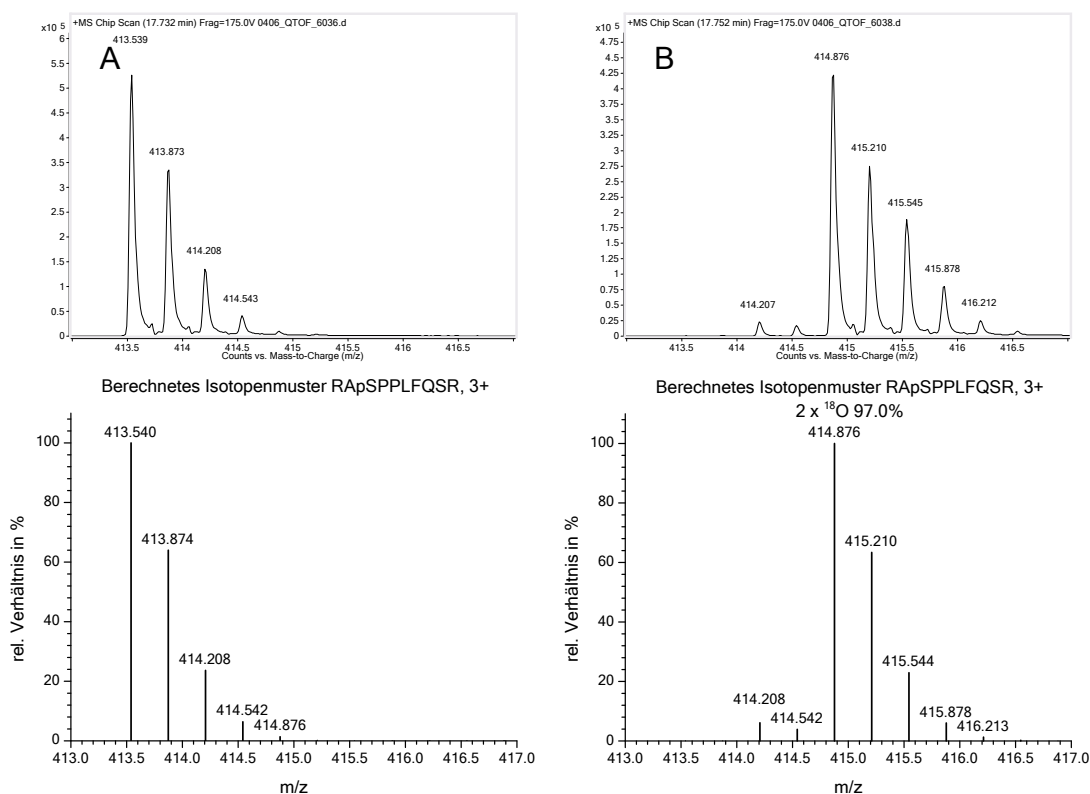
## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling



**Abbildung 10.13** – Gemessene und berechnete Isotopenmuster von RAPSPLFQSR, 3+ ungelabelt und mit  $^{18}\text{O}$ -Labeling in HCl; bei der Isotopenmarkierung kommt es zum Austausch von zwei Sauerstoffatomen, die Einbaurate des  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffs liegt bei ca. 96%. Zudem ist eine leichte Erhöhung des Isotopenpeaks mit 421,238 m/z bei der Messung des gelabelten Peptids zu beobachten. Die Ursache dieser Abweichung ist im Abschnitt 10.3.2 ab Seite 167 beschrieben.

penmuster nach dem Labeling weitgehend den berechneten Werten. Die Isotopenpeaks mit den m/z Werten 415,5445 und 415,8782 sind jedoch im Vergleich zum berechneten Isotopenmuster erhöht, was für die Inkorporation weiterer  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffatome spricht. Dieses Phänomen wurde in Abschnitt 10.3.2 ab Seite 167 näher untersucht.

Abbildung 10.15 auf Seite 158 zeigt, dass auch bei dem Phosphopeptid nur wenige Nebenprodukte während der Reaktion auftreten. Dabei handelt es sich wie beim Glu-Fib vor allem um hydrolytische Spaltprodukte und um das desamidierte Peptid. Dieses wird an der Glutaminsäure isotope markiert, die durch die Desamidierung von Glutamin entstanden ist. Der mit 5A bezeichnete Peak in der Abbildung wurde als das an Serin



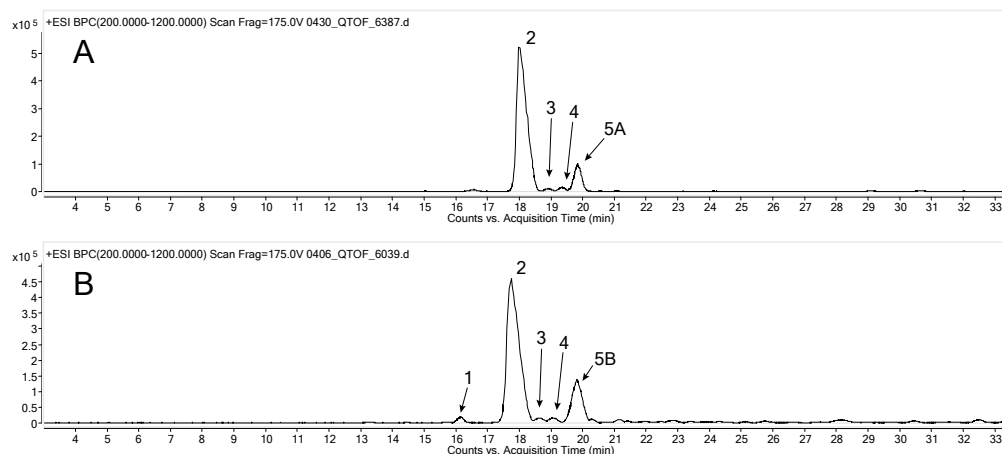
- A | phosphoryliertes Aqua-Peptid unbehandelt  
 B | phosphoryliertes Aqua-Peptid  $\text{HCl} \geq 37\%$   $\text{H}_2^{18}\text{O}$  99% 15 °C 5 h 30 min,  
 Trocknung mit Stickstoff für 30 min

**Abbildung 10.14** – Gemessene und berechnete Isotopenmuster von RApSPPLFQSR (1× phosphoryliert), 3+ unmarkiert und mit  $^{18}\text{O}$ -Labeling in  $\text{HCl}$ ; bei der Isotopenmarkierung kommt es zum Austausch von zwei Sauerstoffatomen, die Einbaurrate des  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffes liegt bei ca. 96 %. Hier ist ebenfalls eine leichte Erhöhung des Isotopenpeaks mit 415,545  $m/z$  bei der Messung des gelabelten Peptids zu beobachten, siehe auch Abschnitt 10.3.2 ab Seite 167.

formylierte Peptid identifiziert, welches vermutlich ein Nebenprodukt aus der Peptidsynthese ist. Im sauren Milieu wird dieses quantitativ an der Amidbindung N-terminal des formylierten Serins gespalten und es ergibt sich das Spaltprodukt 5B.

Da theoretischerweise auch eine säurekatalysierte Dephosphorylierung am Serin des Phosphopeptids möglich ist, wurde nach der Masse des dephosphorylierten Peptids im MS-Spektrum gesucht. Wie in Abbildung 10.16 auf Seite 159 zu erkennen ist, gibt es einen geringen Grad an Dephosphorylierung. Dieser Anteil beträgt jedoch weniger als 0,7 %. Um den möglichen Austausch von Sauerstoffatomen an der Phosphatgruppe zu untersuchen, wurde im MS/MS-Spektrum des Peptids das Isotopenmuster des  $b_6$ -Ions

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling



A	phosphoryliertes Aqua-Peptid unbehandelt
B	phosphoryliertes Aqua-Peptid $\geq 37\%$ $\text{H}_2^{18}\text{O}$ 99 % 15 °C 5 h 30 min, Trocknung mit Stickstoff für 30 min

1	? , 1+
2	RApSPPLFQSR, 3+, B: $2 \times ^{18}\text{O}$
3	RApSPPLFQSR, 3+, desamidiert, B: $3 \times ^{18}\text{O}$
4	ApSPPLFQSR, 2+, B: $2 \times ^{18}\text{O}$
5A	RApSPPLFQSR, 3+, Formyliert
5B	RApSPPLFQ, 2+, B: $2 \times ^{18}\text{O}$

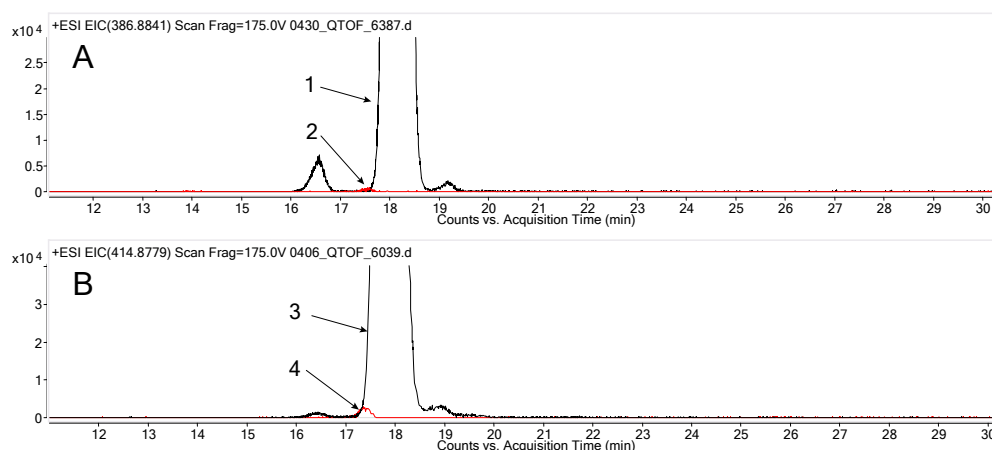
**Abbildung 10.15** – Base-Peak-Chromatogramme von RApSPPLFQSR (1× phosphoryliert), 3+ unbehandelt und mit  $^{18}\text{O}$ -Labeling in HCl; beim Vergleich der Base-Peak-Chromatogramme sind nur geringe Unterschiede von unbehandeltem und isotoopenmarkiertem Peptid zu erkennen. Das vermutlich bei der Synthese entstandene Peptid mit einem formylierten Serin (5A), wird durch die Salzsäure N-terminal des formylierten Serins gespalten (5B).

analysiert. Das gemessene Isotopenmuster wurde mit der berechneten Variante ohne Sauerstoffaustausch verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10.17 auf Seite 160 abgebildet. Wie zu erkennen ist, entspricht das gemessene Isotopenmuster des  $\text{b}_6$ -Ions dem berechneten Muster des Fragmentions ohne Austausch von  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff. Offensichtlich gibt es bei den gegebenen Reaktionsbedingungen keinen Austausch von Phosphatsauerstoff mit dem Medium.

### $^{18}\text{O}$ -Labeling zur relativen Quantifizierung von Peptidmischungen

Nach der Optimierung des  $^{18}\text{O}$ -Labelings an einzelnen Peptiden, wurden weitere Versuche zur Anwendung der Methode für die relative Quantifizierung von Peptidmischungen durchgeführt. Als Probe wurde dafür der „Protein mixture digest“ von Dionex eingesetzt. Jeweils 1 pmol der Mischung wurde in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben und unter Va-





- |   |                                                                                                                                          |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A | phosphoryliertes Aqua-Peptid unbehandelt                                                                                                 |
| B | phosphoryliertes Aqua-Peptid HCl $\geq 37\%$ H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O 99% 15 °C 5 h 30 min,<br>Trocknung mit Stickstoff für 30 min |

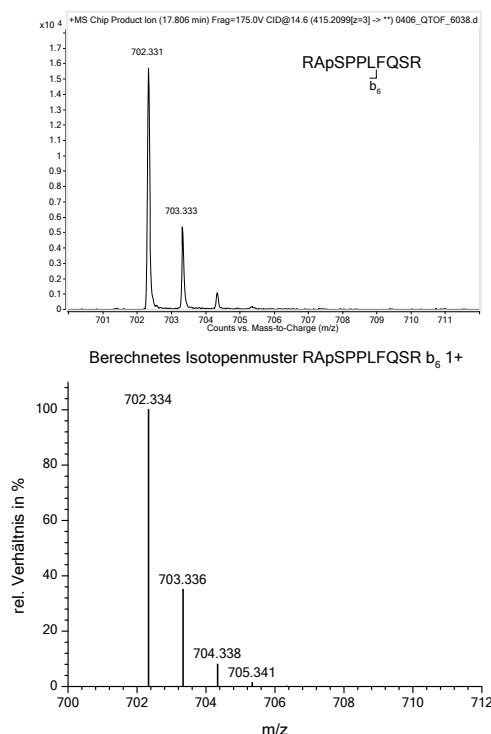
- |   |                                                   |
|---|---------------------------------------------------|
| 1 | RApSPPLFQSR, 3+, m/z 413,5395                     |
| 2 | RASPPLFQSR, 3+, m/z 386,8841                      |
| 3 | RApSPPLFQSR, 3+, 2× <sup>18</sup> O, m/z 414,8779 |
| 4 | RASPPLFQSR, 3+, 2× <sup>18</sup> O, m/z 388,2231  |

**Abbildung 10.16** – Vergleich der säurekatalysierten Dephosphorylierung von RApSPPLFQSR unbehandelt und mit <sup>18</sup>O-Labeling in HCl; bei der isotopenmarkierten Probe (B) ist im Vergleich zur unbehandelten Probe (A) ein geringer Anteil von Dephosphorylierung zu beobachten.

kuum vollständig getrocknet. Anschließend wurden die Proben wie oben beschrieben temperiert und einmal mit 5 µl konzentrierter HCl in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O und einmal mit 5 µl konzentrierter HCl in H<sub>2</sub><sup>18</sup>O versetzt. Die Reaktion wurde erneut bei 15 °C für 5 Stunden und 30 Minuten durchgeführt. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Proben mit wasserfreiem Stickstoff getrocknet und die restliche Säure mit 5 µl NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub><sup>16</sup>O respektive H<sub>2</sub><sup>18</sup>O neutralisiert. Danach wurden die Proben vereinigt und mit Wasser und Acetonitril auf 20 µl 3 % ACN in Wasser ergänzt. Von der Probe wurden je 5 µl entsprechend je 250 fmol der leichten und schweren Variante des Dionex-Mix am Q-TOF gemessen. Der Arbeitsablauf zur Isotopenmarkierung für die relative Quantifizierung ist in Abbildung 10.18 auf Seite 161 gezeigt.

Durch die gleiche Behandlung von unmarkierter und zu markierender Probe mit Salzsäure in leichtem und schwerem Wasser relativieren sich die Fehler, die z.B. durch Nebenreaktionen im sauren Milieu entstehen. Da bei dem „Protein Mixture Digest“ von Dionex die Cysteine mit Iodessigsäure modifiziert sind, findet an den carboxymethylierten Cysteinen ebenfalls ein Austausch von <sup>18</sup>O-Sauerstoff statt. In der Quantifizierungsmethode von Mascot Server wurde daher die Carboxymethylgruppe ebenfalls in leichter und schwerer Variante definiert und somit alle am Peptid vorhandenen Carboxygruppen

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling

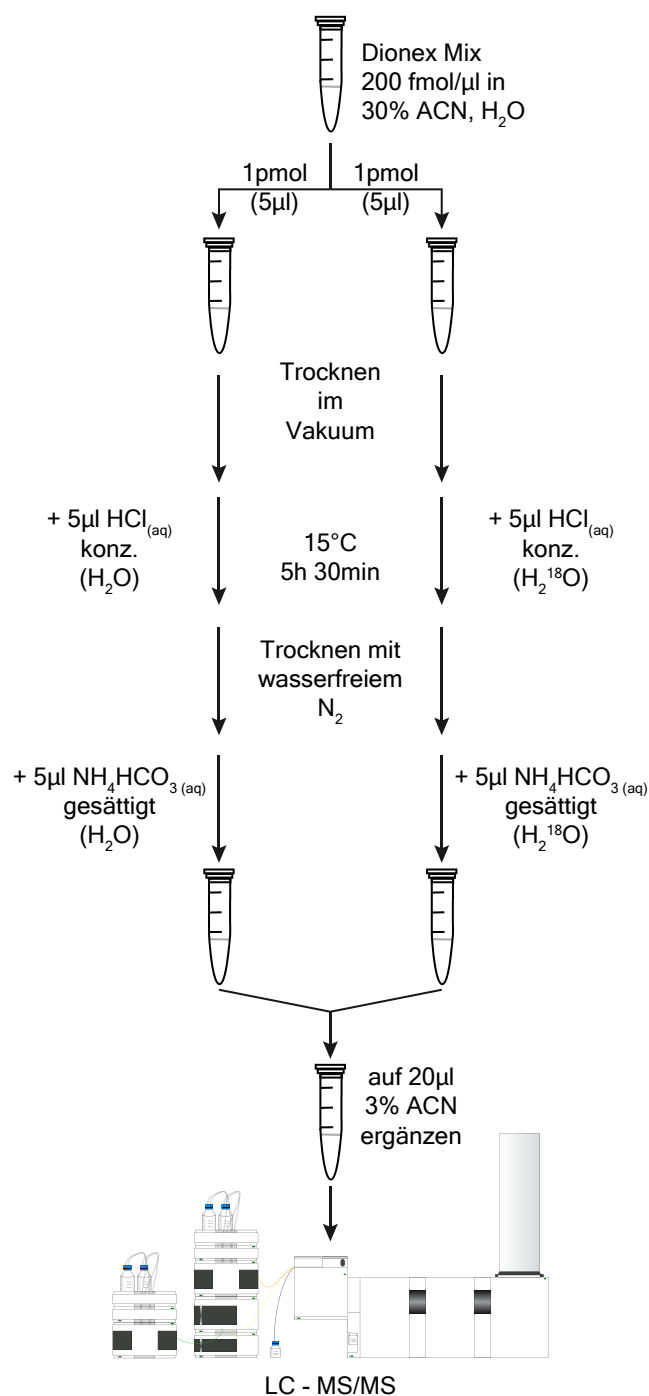


**Abbildung 10.17** – Isotopenmuster des Fragmentions  $b_6, 1+$  von RApSPPLFQSR; das gemessene Isotopenmuster entspricht dem theoretischen Isotopenmuster ohne Austausch von  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff an der Phosphatgruppe, es findet an dieser unter den verwendeten Bedingungen kein Austausch von Sauerstoff statt.

berücksichtigt. Die Software verwendet die in Tabelle 10.1 auf Seite 162 aufgeführten Paare für die Identifizierung und Quantifizierung der Peptide.

Das Quantifizieren einer Probe mit einer äquimolaren Mischung von unmarkierten und isotoopenmarkierten Peptiden des *Protein Mixture Digest* von Dionex mittels der Mascot Distiller *Quantitation Toolbox* ergab die in Tabelle 10.2 auf Seite 162 aufgeführten Verhältnisse von leichter zu schwerer Probe. Für das Quantifizieren wurden dabei nur Peptide verwendet, deren Isotopenmuster dem berechneten Isotopenmuster der Software entsprach. Wie zu erwarten war, wiesen die verschiedenen Peptide je nach Sequenz einen unterschiedlich starken Austausch von  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff auf. Im Folgenden sind zwei Beispiele aufgeführt, die einen Austausch von zwei und von 16 Sauerstoffatomen aufweisen, siehe Abbildung 10.19 auf Seite 163. Das rote und das schwarze Chromatogramm zeigen hierbei das gemessene und das von Mascot-Distiller berechnete Isotopenmuster.

Wie in Abbildung 10.19 auf Seite 163 dargestellt, werden beim Peptid GYLAVAVVK (A) nur die Sauerstoffe am C-Terminus ausgetauscht, während beim Peptid CCAADD-KEACFAVEGPK (B) der Austausch von zwei Sauerstoffen am C-Terminus, zwei Asparaginsäuren, zwei Glutaminsäuren und drei carboxymethylierten Cysteinen zu beobach-



**Abbildung 10.18** – Arbeitsablauf zur Isotopenmarkierung von Peptiden des Dionex-Mix mit <sup>18</sup>O-Sauerstoff; sowohl die leichte als auch die schwere Probe werden mit Salzsäure in H<sub>2</sub>O und H<sub>2</sub><sup>18</sup>O behandelt. Dadurch gleichen sich Einflüsse während der Isotopenmarkierung, wie z.B. durch die Hydrolyse, aus.

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling

Gruppe	
Leicht	Schwer
C-Terminus $2\times^{16}\text{O}$	C-Terminus $2\times^{18}\text{O}$
Glutaminsäure $2\times^{16}\text{O}$	Glutaminsäure $2\times^{18}\text{O}$
Asparaginsäure $2\times^{16}\text{O}$	Asparaginsäure $2\times^{18}\text{O}$
Carboxymethyl-Cystein $2\times^{16}\text{O}$	Carboxymethyl-Cystein $2\times^{18}\text{O}$

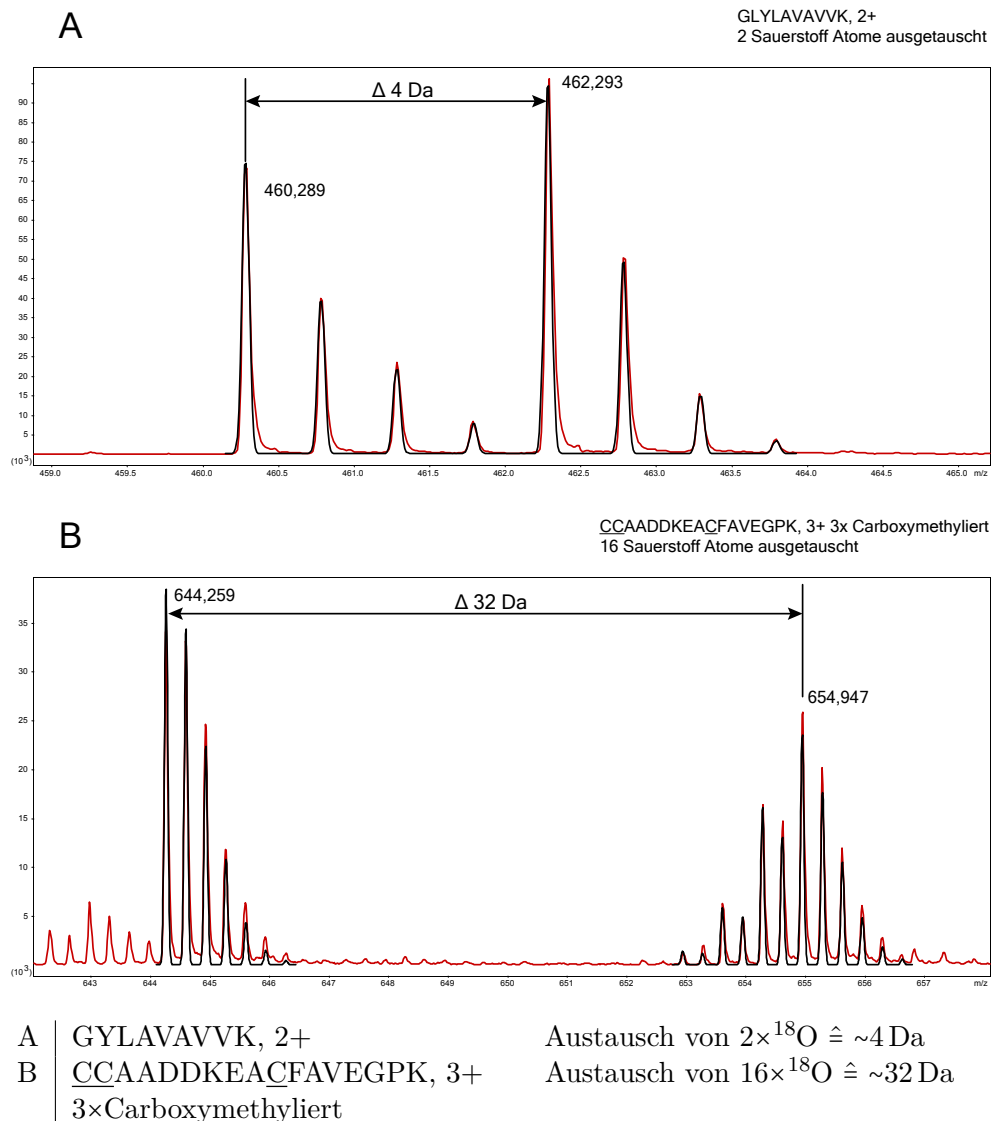
**Tabelle 10.1** – Einstellung der Mascot Quantifizierungsmethode für das  $^{18}\text{O}$ -Labeling; dabei wurden die gezeigten Gruppen jeweils in leichter und schwerer Variante definiert.

Protein	Molekulare Masse	Mascot Score	Anzahl an Peptiden	Verhältnis Schwer/Leicht
Transferrin	77703	3590	36	$0,99 \pm 0,09$
Albumin	69248	3082	40	$0,97 \pm 0,17$
Alcohol dehydrogenase	36800	802	11	$1,02 \pm 0,12$
Beta-galactosidase	116409	459	3	$1,27 \pm 0,11$
Lysozyme	16228	497	3	$0,98 \pm 0,09$
Cytochrome C	11697	353	5	$1,10 \pm 0,05$

**Tabelle 10.2** – Gemessene Verhältnisse der Proteine (Schwer/Leicht) einer 1:1 Mischung des Dionex-Mix nach  $^{18}\text{O}$ -Labeling mit HCl; eine Hälfte des Peptidmischung wurde mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff isotopenmarkiert die andere Hälfte ist unmarkiert.

ten ist, was insgesamt einem Austausch von 16 Sauerstoffatomen entspricht. In den Abbildungen 10.21 und 10.22 auf den Seiten 165 und 166 sind die jeweiligen  $\text{MS}^2$ -Spektren der beiden Peptide abgebildet. Bei dem Peptid GYLAVAVVK in Abbildung 10.21 ist dabei zu beobachten, dass sowohl jeweils die schwere als auch die leichte Variante des Peptids im Fragmentspektrum zu beobachten ist. Dies beruht auf der Isolationsbandbreite des Quadrupols des Q-TOF-Massenspektrometers, welche bei den Messungen auf eine Isolationsbreite des Precursors von ca. 4 Da eingestellt ist. Beim Peptid CCAADDKEACFAVEGPK in Abbildung 10.22 ist dieses Phänomen nicht zu beobachten, da die Massendifferenz der beiden Varianten größer ist. In beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass die Markierung mit den  $^{18}\text{O}$ -Isotopen die Fragmentierung der Peptide nicht beeinflusst.

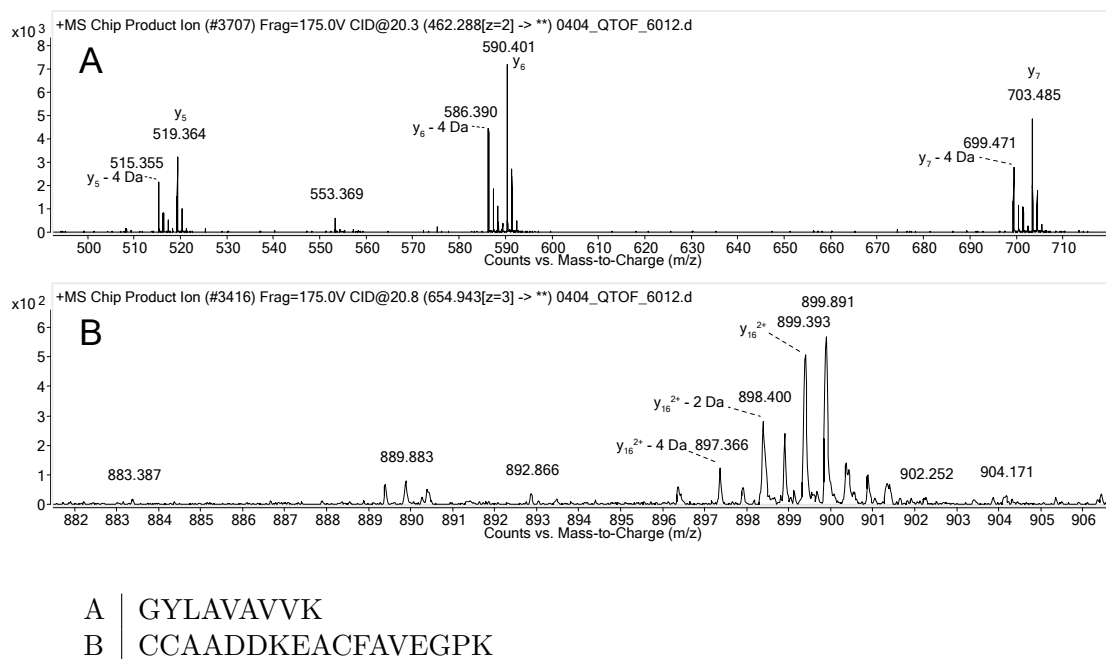
In Abbildung 10.20 auf Seite 164 sind nochmals Ausschnitte der  $\text{MS}^2$ -Spektren der Peptide GYLAVAVVK (A) und CCAADDKEACFAVEGPK (B) dargestellt. Diese zeigen die Satellitenpeaks von Fragmentationen der beiden Peptide. Beim Peptid GYLAVAVVK kommen die Satellitenpeaks wie erwähnt durch die Isolationsbandbreite des Quadrupols und den geringen Abstand zwischen dem leichten und schweren Peptid zustande. Beim Peptid CCAADDKEACFAVEGPK hingegen entstehen die Satellitenpeaks durch den unvollständigen Austausch der 16 Sauerstoffatome. Da jedes der Sauerstoffatome



**Abbildung 10.19** – Berechnete (schwarz) und gemessene Isotopenmuster (rot) der Peptide GLYLAVAVVK von TRFE (A) und CCAADDKEACFAVEGPK von BSA (B) nach  ${}^{18}\text{O}$ -Labeling mit HCl; beim Peptid GLYLAVAVVK kommt es nur zum Austausch der zwei Sauerstoffatome des C-Terminus, der Massenabstand der beiden Varianten beträgt somit ca. 4 Da; beim Peptid CCAADDKEACFAVEGPK hingegen kommt es durch die Existenz von 8 Carboxygruppen zum Austausch von 16 Sauerstoffatomen und einem Massenabstand von ca. 32 Da.

zu maximal 97 % durch  ${}^{18}\text{O}$ -Sauerstoff ersetzt sein kann, führt eine größere Anzahl an möglichen Austauschvorgängen zu einer Verbreiterung der Isotopenverteilung. Werden bei der Definition der  ${}^{18}\text{O}$ -markierten Carboxygruppen in Mascot Server zusätzlich die

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling



**Abbildung 10.20** – Isotopenmuster mit Satellitenpeaks im Fragmentspektrum von GYLAVAVVK und CCAADDKEACFAVEGPK; bei GYLAVAVVK (A) kommen die Satellitenpeaks durch die geringen Massendifferenz des markierten zum unmarkierten Peptid zustande, es werden beide Varianten durch den Quadrupol isoliert; beim Peptid CCAADDKEACFAVEGPK (B) entstehen die Satellitenpeaks durch die hohe Anzahl an Carboxygruppen und die Markierungsrate von ca. 97%.

Verluste der Isotopenmarkierungen als Satellitenpeaks angegeben, kann damit der Score der isotopemarkierten Peptide bei der Datenbanksuche erhöht werden. So ergibt die zusätzliche Definition von Neutralverlusten von 2,004 246 Da ( $1 \times ^{18}\text{O}$ ) und 4,008 491 Da ( $2 \times ^{18}\text{O}$ ) bei den isotopemarkierten Spezies von Asparaginsäure, Glutaminsäure und dem C-Terminus in einigen Fällen höhere Mascot-Scores. Dies ist für eine Suche des Dionex-Mix in Tabelle 13 ab Seite 244 im Anhang dargestellt.

Da bei der Behandlung der Probe mit konzentrierter HCl über einen längeren Zeitraum auch eine hydrolytische Spaltung der Peptide auftritt, wurde untersucht, inwiefern dieser Umstand die Probe beeinflusst. Dazu wurde der Dionex-Mix je einmal mit Wasser und einmal mit konzentrierter HCl versetzt und bei 15 °C über 5 Stunden und 30 Minuten inkubiert. Die beiden Proben wurden anschließend getrocknet, am Q-TOF gemessen und die Ergebnisse der Datenanalyse mit Pepview einander gegenübergestellt. Die so erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen 7 bis 12 auf den Seiten 232 bis 242 im Anhang zu finden. Wie in den Tabellen zu erkennen ist, finden sich bei der Messung nur relativ wenige durch Hydrolyse neu entstandene Peptide.

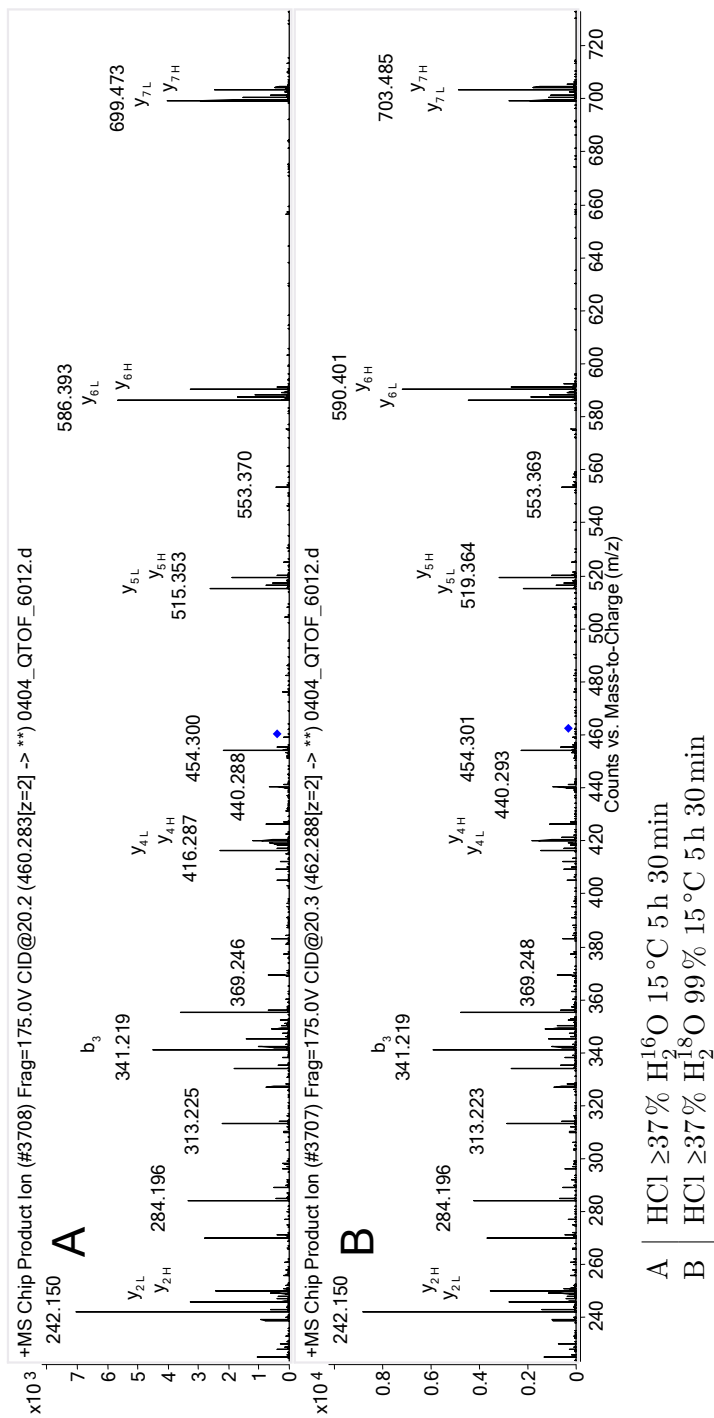
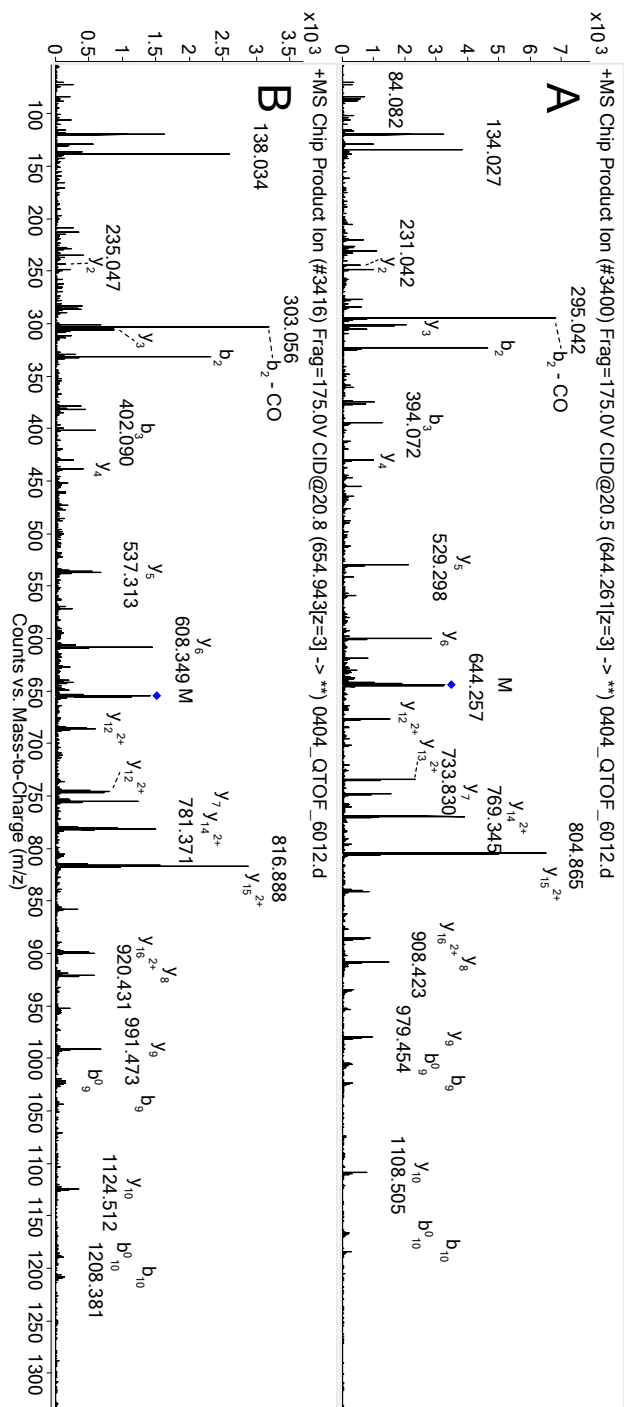


Abbildung 10.21 – Fragmentenspektren der leichten und schweren Variante des Peptids GYLAVAVVK von TRFE nach <sup>18</sup>O-Labeling



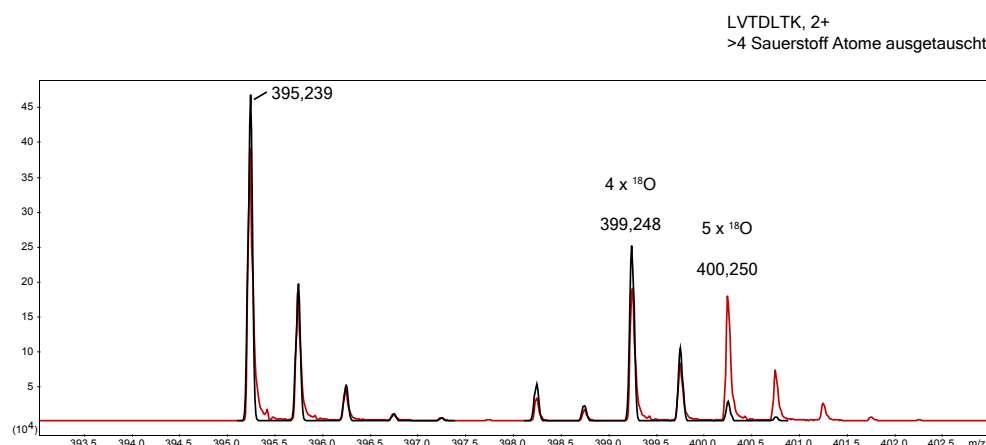
**Abbildung 10.22** – Fragmentenspektren der leichten und schweren Variante des Peptids CCAADDKKAEACFAVEGPK von BSA nach  $^{18}\text{O}$ -Labeling



### 10.3.2 Einbau von $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff bei weiteren Aminosäuren

Bei der  $^{18}\text{O}$ -Isotopenmarkierung des „*Protein mixture digest*“ war bei bestimmten Peptiden in der schwer gelabelten Variante zu erkennen, dass das gemessene Isotopenmuster vom berechneten abwich. Eine Analyse dieser Peptide ergab, dass es sich dabei vor allem um threoninhaltige Peptide handelte. Bei serinhaltigen Peptiden war der gleiche Effekt zu beobachten, obgleich er bei diesen wesentlich schwächer ausfiel.

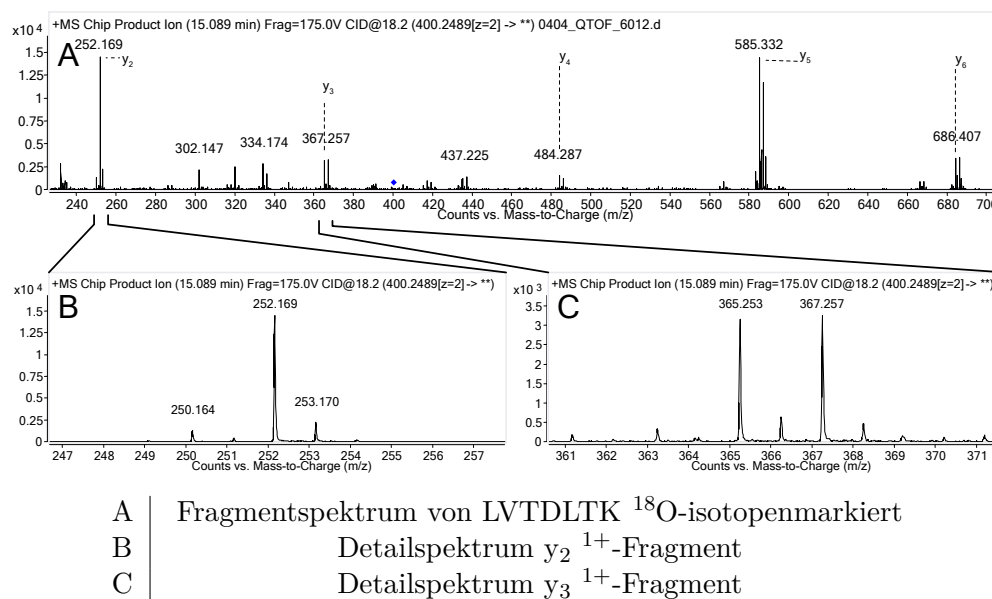
In Abbildung 10.23 auf Seite 167 ist die Abweichung im Isotopenmuster gut zu erkennen. Diese lässt sich dadurch erklären, dass ein  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffatom mehr als berechnet, entsprechend einen Massenunterschied von 2 Da, in das Peptid eingebaut wird. In Folge ist die Quantifizierung für das entsprechende Peptid nicht mehr korrekt, da die Software Mascot Distiller für die Quantifizierung der Peakflächen der leichten und der schweren Variante des Peptids das Verhältnis der berechneten Isotopenpeaks berücksichtigt. In künftigen Versionen der Mascot Distiller *Quantitation Toolbox* besteht die Möglichkeit, diese Abweichung mit Hilfe der Definition von Satellitenpeaks zu berücksichtigen. Da diese Funktion in der aktuellen Version der Software noch nicht berücksichtigt wird, ist das Ergebnis der Quantifizierung bei entsprechenden Peptidpaaren mit einem Fehler behaftet. Somit fällt die quantifizierte Menge an schwerem Peptid bei Peptiden mit zusätzlichem Einbau von  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff zu gering aus.



**Abbildung 10.23** – Berechnete und gemessene Isotopenmuster des Peptids LVTDLTk von BSA nach  $^{18}\text{O}$ -Labeling mit  $\text{HCl} \geq 37\%$   $\text{H}_2^{18}\text{O}$  99% 15 °C 5 h 30 min; im gemessenen Spektrum (rot) ist der zusätzliche Einbau eines  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffes im Vergleich zum berechneten Isotopenmuster (schwarz) zu erkennen.

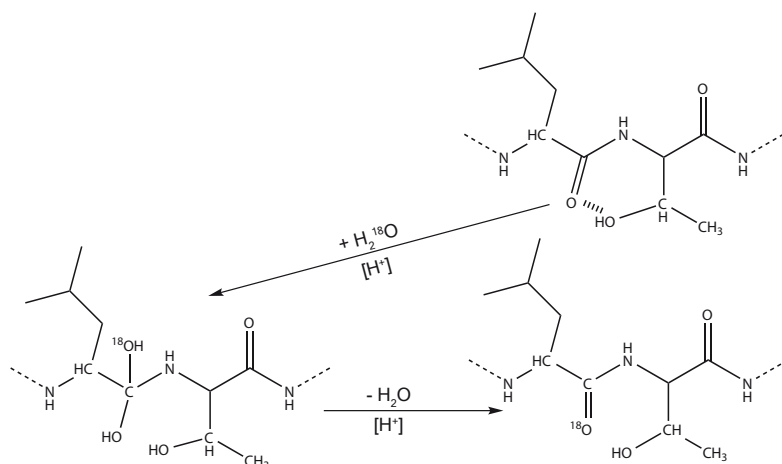
In der Tabelle in Abbildung 10.24 auf Seite 168 sind die mit der Software Pepmass berechneten möglichen Fragment-Ionen für das am C-Terminus und an der Asparaginsäure mit je zwei  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffatomen isotopenmarkierte Peptid LVTDLTk dargestellt. Bei der Analyse des Fragmentspektrums ließ sich erkennen, an welcher Stelle der Sequenz das zusätzliche  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffatom ausgetauscht wurde.

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling



Sequenz						
#	$b^{2+}$	$b^{1+}$		$y^{1+}$	$y^{2+}$	#
1	57,5493	114,0913	L			7
2	107,0835	213,1598	V	684,4046	342,7059	6
3	157,6074	314,2074	T	585,3362	293,1717	5
4	217,1251	433,2429	D	484,2885	242,6479	4
5	273,6671	546,3269	L	365,2530	183,1302	3
6	324,1909	647,3746	T	252,1690	126,5881	2
7			K	151,1213	76,0643	1

**Abbildung 10.24** – Lokalisierung der zusätzlichen Markierung mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff im Fragmentspektrum von LVTDLTK nach  $^{18}\text{O}$ -Labeling; die Tabelle zeigt die berechneten Fragmentationen des Peptids nach der Isotopenmarkierung. Demnach ist sowohl beim  $y_2$ - (B) als auch beim  $y_3$ -Ion (C) das Isotopenmuster des Einbaus von 97%  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff an der Carboxygruppe am C-Terminus des Peptids zu erwarten. Das  $y_3$ -Ion zeigt jedoch ein abweichendes Isotopenmuster, welches auf einen Austausch von  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff am Leucin hinweist. Da die Aminosäure Leucin im Peptid nur einen Sauerstoff in der Amidbindung besitzt, findet der Austausch dort statt.

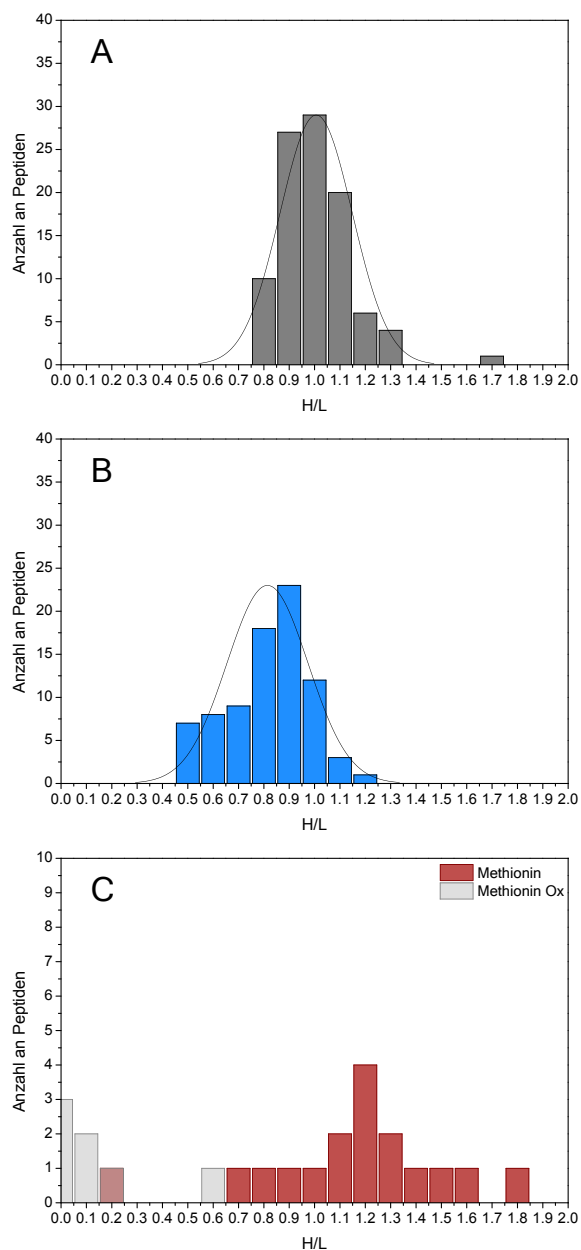


**Abbildung 10.25** – Vermutlicher Mechanismus der Substitution von  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff am Peptidgrundgerüst N-terminal von Threonin

So ist im Fragmentspektrum in Abbildung 10.24 auf Seite 168 zu erkennen, dass das  $y_2$ -Ion (B) noch das Isotopenmuster besitzt, welches durch den Austausch von zwei  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffatomen mit einer Rate von 97 % am C-Terminus zustande kommt. Das  $y_3$ -Ion (C) besitzt hingegen ein verändertes Isotopenmuster, welches durch einen zusätzlichen Isotopenpeak mit einem  $m/z$  von 367,257 ( $\Delta$  2 Da) auf den Austausch eines weiteren Sauerstoffatoms hinweist. Da die Aminosäure Leucin, an welcher der Austausch stattfindet, nur ein einzelnes Sauerstoffatom an der Amidbindung besitzt, muss dieses folglich ausgetauscht werden. Vermutlich wird der Austausch durch die Seitenkette des Threonin begünstigt. Im Peptid findet sich noch ein weiteres Threonin, bei dem N-terminal jedoch kein Sauerstoffaustausch stattfindet. Unter Umständen gründet dies in der sterischen Hinderung durch die näher am Peptidgrundgerüst verzweigte Seitenkette des Valins.

Der vermutliche Mechanismus der Austauschreaktion an der Amidbindung ist in Abbildung 10.25 auf Seite 169 dargestellt. Neben dem Austausch von Sauerstoffatomen N-Terminal von Threonin und Serin waren bei der Quantifizierung auch abweichende Quantifizierungsergebnisse bei Peptiden zu beobachten, welche Methionin enthielten. Bei der Isotopenmarkierung mit  $\text{HCl}$  in  $^{18}\text{O}$ -Wasser scheint ein Austausch von Sauerstoff am oxidierten Methionin vorzuliegen, bzw. es findet eine Oxidation des Methionins statt. Da die Oxidationsrate bei den leichten und den schweren Peptiden offensichtlich nicht gleichmäßig ist, bzw. das Labeling bei der schweren Variante nicht vollständig stattfindet, ergeben sich bei methioninhaltigen Peptiden starke Abweichungen bei der Quantifizierung. Dies könnte umgangen werden, wenn die Peptide vor der Isotopenmarkierung am Methionin vollständig oxidiert würden. Die Oxidation des Methionins könnte in diesem Falle beispielsweise mit Wasserstoffperoxid erfolgen. In Abbildung 10.26 auf Seite 170 sind die ermittelten Quantifizierungsergebnisse für eine 1:1-Mischung des Proteinmix von Dionex in der leichten und schweren Form zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die threoninhaltigen Peptide eine systematische Abweichung verursachen. Die me-

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling



- |   |                                     |                                                         |
|---|-------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| A | Peptide ohne Threonin und Methionin | Mittelwert: 1,01 ( $\pm 0,14$ )                         |
| B | Threonin enthaltende Peptide        | Mittelwert: 0,81 ( $\pm 0,16$ )                         |
| C | Methionin enthaltenden Peptide      | Mittelwert: 1,88 ( $\pm 3,12$ ), Ox 0,16 ( $\pm 0,21$ ) |

**Abbildung 10.26** – Verteilung der gemessenen Verhältnisse (Schwer/Leicht) von Peptiden einer 1:1-Mischung des Dionex-Mix nach  $^{18}\text{O}$ -Labeling; bei Peptiden ohne Threonin und Methionin (A) entspricht der Mittelwert den Erwartungen, bei threoninhaltigen und methioninhaltigen Peptiden (C) weichen die Mittelwerte ab.

thioninhaltigen Peptide ergeben eine wesentlich größere Abweichung mit einer erheblich größeren Streuung.

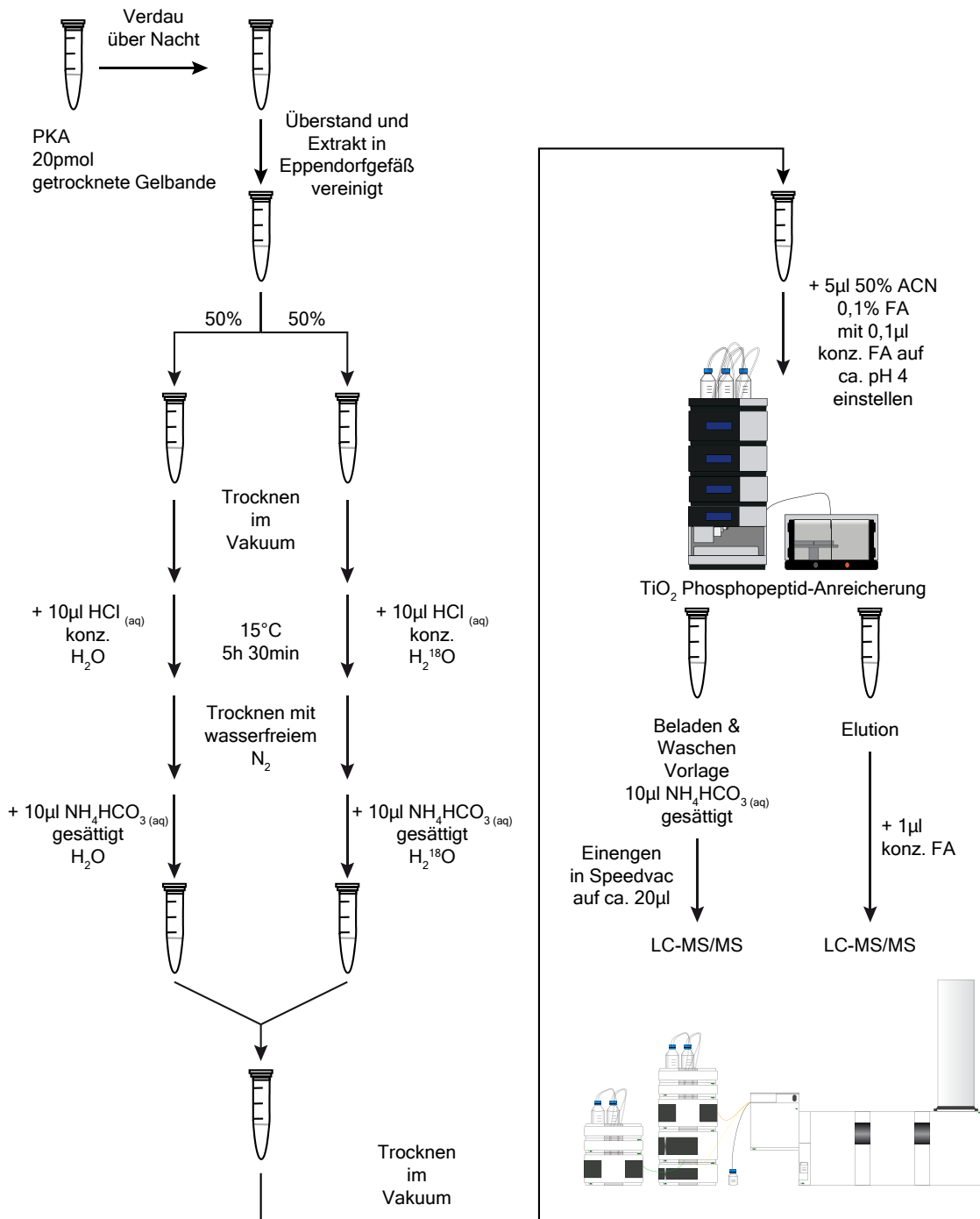
### 10.3.3 $^{18}\text{O}$ -Labeling an Phosphopeptiden von PKA

Im Anschluss an das Quantifizieren der Peptidmischung wurde geprüft, ob das säurekatalysierte  $^{18}\text{O}$ -Labeling kompatibel zu der Anreicherung von Phosphopeptiden mittels  $\text{TiO}_2$  ist, und ob es somit für die Bestimmung von Phosphorylierungsstellen durch Multiproteaseverdau nach Schlosser et al. (2005) geeignet ist.

Dazu wurden drei getrocknete Gelbanden mit jeweils 20 pmol PKA mit den Proteasen Trypsin, Elastase und Thermolysin über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  verdaut. Nach dem Verdau wurde der Flüssigkeitsüberstand über dem Gel abgenommen und die Peptide aus den Gelstücken für 30 Minuten mit 20  $\mu\text{l}$  0,1 % FA und 50 % ACN extrahiert. Der Überstand und der Extrakt der jeweiligen Protease wurden wieder vereinigt und dann zu gleichen Teilen aufgeteilt. Die aufgeteilten Proben wurden dann im Vakuum vollständig getrocknet. Die Probe für die leichte Isotopenmarkierung wurde anschließend mit 10  $\mu\text{l}$  konzentrierter HCl in  $\text{H}_2^{16}\text{O}$ , die Probe für die schwere Isotopenmarkierung mit 10  $\mu\text{l}$  konzentrierter HCl in  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  versetzt. Die Reaktion wurde für 5 Stunden und 30 Minuten bei  $15^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Proben wurden mit wasserfreiem Stickstoff getrocknet und letzte Säurereste mit gesättigtem  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in  $\text{H}_2^{16}\text{O}$  für die leichte Probe und gesättigtem  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  in  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  für die schwere Probe neutralisiert. Daraufhin wurden die beiden Proben vereinigt und erneut im Vakuum vollständig getrocknet. Die Probe wurde dann mit 5  $\mu\text{l}$  0,1 % FA 50 % ACN aufgenommen und mit 0,1  $\mu\text{l}$  konzentrierter FA auf einen pH-Wert von ca. 4 eingestellt und die Phosphopeptide mittels  $\text{TiO}_2$  angereichert, wie in Abschnitt 3.9 ab Seite 37 beschrieben. Die mobile Phase der Injektion und des Waschschrittes wurde in ein Probenfläschchen gesammelt, in das 10  $\mu\text{l}$  gesättigte  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  Lösung vorgelegt waren, um einen eventuellen säurekatalysierten Rücktausch der Isotopenmarkierung zu verhindern. Das Vial mit dem Eluat wurde mit 1  $\mu\text{l}$  konzentrierter FA angesäuert und am Q-TOF gemessen, das Vial mit dem Durchlauf des Lade- und Waschschrittes wurde vor der Messung auf ein Volumen von 20  $\mu\text{l}$  eingeeengt. Das Schema des Ablaufs ist in Abbildung 10.27 auf Seite 172 dargestellt.

Wie in Tabelle 10.3 zu sehen ist, ergibt sich für unterschiedliche Peptide, generiert durch verschiedene Proteasen, eine gute Korrelation der Quantifizierungsergebnisse. Bei den Peptiden ist dabei kein Rücktausch von  $^{16}\text{O}$ -Sauerstoff zu beobachten. Dies weist auf eine nicht vorhandene enzymatische Katalyse des Sauerstoffaustauschs und somit auf eine Inaktivierung der für den Verdau verwendeten Proteasen durch die Behandlung mit HCl hin. Geringe Schwankungen der ermittelten Verhältnisse von schwerer zu leichter Probe unter den verschiedenen Proteasen ergeben sich aus der separat durchgeführten Probenvorbereitung. Auch bei diesem Versuch ist der systematische Fehler beim Quantifizieren threoninhaltiger Peptide zu erkennen, siehe Abbildung 10.28 auf Seite 174.

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling



**Abbildung 10.27** – Arbeitsablauf zur säurekatalysierten Isotopenmarkierung von Phosphopeptiden mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff und anschließender Anreicherung mit  $\text{TiO}_2$ ; die Proben werden nach der Isotopenmarkierung vereinigt und der Phosphopeptidanreicherung unterzogen.

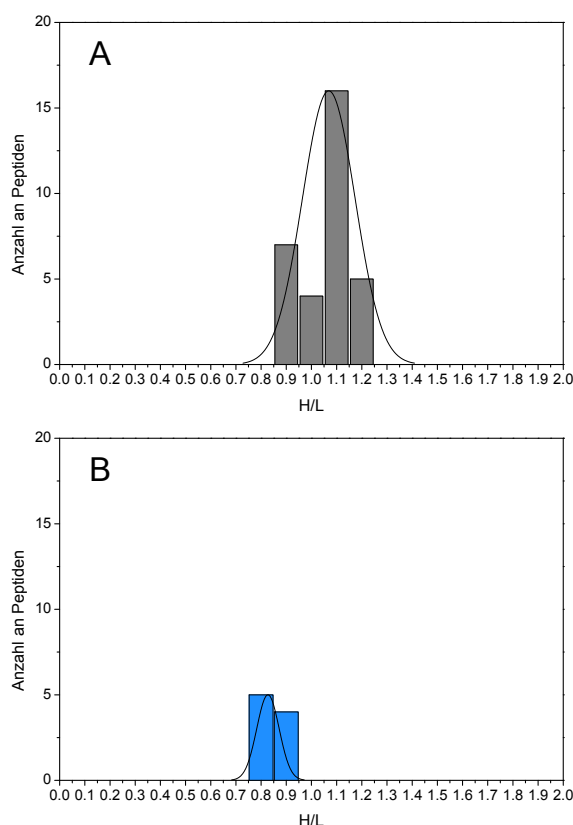
Phosphorylierungsstelle	Peptid	Schwer/Leicht	Protease	Modifikation	Threoninhaltig
S-11	AAKKGpSEQESVKEFLA	1,01	Elastase		
	AAKKGpSEQESVKEFLA	0,91	Elastase		
	AKKGpSEQESVKEFLA	0,91	Elastase		
	AKKGpSEQESVKEFLA	0,92	Elastase		
	KKGpSEQESVKEFLAK	1,05	Trypsin		
	KKGpSEQESVKEFLAK	1,13	Trypsin		
	KKGpSEQESVKEFLAKA	0,94	Elastase		
	KKGpSEQESVKEFLAKA	0,90	Elastase		
	KKGpSEQESVKEFLA	0,88	Elastase		
	KKGpSEQESVKEFLA	0,88	Elastase		
	KGpSEQESVKEFLAK	1,06	Trypsin		
	KGpSEQESVKEFLAK	1,14	Trypsin		
	KGpSEQESVKEFLAK	1,12	Trypsin		
	GpSEQESVKEFLA	0,98	Elastase		
	GpSEQESVKEFLAK	1,08	Trypsin		
	GpSEQESVKEFLAK	1,08	Trypsin		
	pSEQESVKEFLAK	1,11	Trypsin		
	pSEQESVKEFLAK	1,10	Trypsin		
	pSEQESVKEFLA	0,97	Elastase		
S-140	RIGRFpSEPHAR	1,17	Trypsin		
	RIGRFpSEPHAR	1,20	Trypsin		
	IGRFpSEPHARF	1,23	Thermolysin		
	IGRFpSEPHAR	1,15	Trypsin		
	IGRFpSEPHAR	1,14	Trypsin		
	IGRFpSEPHAR	1,11	Thermolysin		
	GRFpSEPHARFYAA	1,12	Elastase		
	GRFpSEPHARFYA	1,13	Elastase		
	RFpSEPHAR	1,23	Trypsin		
S-339	RVpSINEKCGKEF	1,12	Elastase	Carbamidomethyl (C)	
	RVpSINEKCGKEF	1,13	Elastase	Carbamidomethyl (C)	
	IRVpSINEKCGKE	1,12	Thermolysin	Carbamidomethyl (C)	
	IRVpSINEKCGKE	1,18	Thermolysin	Carbamidomethyl (C)	
S-339	FKGPGDTSNFDYEEEEIRVpSINEK	0,87	Trypsin		+
	FKGPGDTSNFDYEEEEIRVpSINEK	0,86	Trypsin		+
	FKGPGDTSNFDYEEEEIRVpSINEK	0,87	Thermolysin		+
	FKGPGDTSNFDYEEEEIRVpSINEK	0,79	Thermolysin		+
	GPGDTSNFDYEEEEIRVpSINEK	0,88	Trypsin		+
	RVpSINEKCGKEFTEF	0,81	Elastase	Carbamidomethyl (C)	+
	RVpSINEKCGKEFTEF	0,81	Elastase	Carbamidomethyl (C)	+
	RVpSINEKCGKEFTEF	0,76	Elastase	Carbamidomethyl (C)	+
	RVpSINEKCGKEFT	0,79	Elastase	Carbamidomethyl (C)	+

**Tabelle 10.3** – Verhältnisse (Schwer/Leicht) einer 1:1-Mischung der Phosphopeptide von PKA nach Verdau mit verschiedenen Proteasen,  $^{18}\text{O}$ -Labeling mit HCl und Phosphopeptidanreicherung mit  $\text{TiO}_2$ ; es ist zu erkennen, dass auch bei der Phosphopeptidanreicherung mit  $\text{TiO}_2$  der isotoopenmarkierten Peptide das Verhältnis von leichter und schwerer Probe nicht verändert wird. Die threoninhaltigen Peptide weisen wiederum eine Verschiebung des Verhältnisses durch den Einbau eines weiteren  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffs auf.

### 10.3.4 $^{18}\text{O}$ -Labeling an Proteinen

Die säurekatalysierte Isotoopenmarkierung mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff wurde in vorangehenden Versuchen auf Peptidebene nach dem proteolytischem Verdau durchgeführt. Jeder Arbeitsschritt vor der Isotoopenmarkierung birgt jedoch die Möglichkeit der Entstehung von Fehlern, welche die Quantifizierung verschlechtern. Daher wurde versucht, die Probe auf Proteinebene vor dem Auftrag auf das Polyacrylamidgel säurekatalysiert mit einer

## 10 Relative Quantifizierung von Peptiden mittels $^{18}\text{O}$ -Labeling



A	Peptide ohne Threonin und Methionin	Mittelwert: 1,07 ( $\pm 0,10$ )
B	Threonin enthaltende Peptide	Mittelwert: 0,83 ( $\pm 0,04$ )

**Abbildung 10.28** – Verteilung der Verhältnisse (Schwer/Leicht) einer 1:1-Mischung der Phosphopeptide von PKA nach  $^{18}\text{O}$ -Labeling mit HCl und Phosphopeptidanreicherung mit  $\text{TiO}_2$ .

$^{18}\text{O}$ -Isotopenmarkierung zu versehen. Dazu wurden 2 pmol getrocknete PKA, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, für 5 h 30 min bei  $15^\circ\text{C}$  mit HCl in  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  behandelt und dann mit wasserfreiem Stickstoff getrocknet. Bei den verwendeten Reaktionsbedingungen findet jedoch ein gewisser Grad an hydrolytischen Vorgängen statt. Dies führt am Protein dazu, dass statt des intakten Proteins verschiedene Proteinbruchstücke vorliegen. Somit verteilen sich die Proteinbruchstücke auf der Gelspur und auf dem Gel sind keine Gelbanden zu erkennen. Unter Umständen wäre es möglich, dieses Problem durch die Verwendung eines Protokolls mit In-Lösungsverdau zu umgehen und das Protein davor mit den  $^{18}\text{O}$ -Isotopen zu markieren. Alternativ wäre auch möglich, das Labeling mit der Hydrolyse des Proteins wie von Liu et al. (2010) beschrieben zu kombinieren, um so ohne proteolytischen Verdau die Peptide für die LC-MS-Messungen zu generieren. Allerdings bedarf die Etablierung dieser Ansätze weiterer Untersuchungen.



## 10.4 Diskussion

Die Methode des säurekatalysierten  $^{18}\text{O}$ -Labelings kann in der derzeitigen Form für die relative Quantifizierung von Peptiden ohne posttranslationale Modifikationen sowie von Phosphopeptiden verwendet werden. Derzeit muss man dabei unter Umständen threoninhaltige und teilweise auch serinhaltige Peptide ausschließen, da bei diesen der Einbau eines weiteren  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoffs stattfinden kann. Sobald die durch den Austausch weiterer Sauerstoffatome auftretenden Satellitenpeaks bei der Datenauswertung berücksichtigt werden können, sind jedoch auch diese Peptide zur Quantifizierung verwendbar. Bei methioninhaltigen Peptiden ist ein Oxidationsschritt vor der säurekatalysierten Isotopenmarkierung ratsam, um diese für das Quantifizieren verwenden zu können. Die hier dargestellte Methode bietet die Möglichkeit, Peptide mit einer hohen Rate an  $^{18}\text{O}$ -Isotopen zu markieren. Verglichen mit der enzymkatalysierten Isotopenmarkierung mit  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff ist bei der säurekatalysierten Variante die Massendifferenz zwischen den leichten und schweren Peptiden, durch die zusätzliche Markierung an den Carboxygruppen der Seitenketten, in vielen Fällen größer. Die Kosten für das Labeling beschränken sich vor allem auf den Kauf des angereicherten  $^{18}\text{O}$ -Wassers. Zudem bietet die Methode, wie auch die enzymkatalysierte Variante den Vorteil, dass die Peptide nicht chemisch durch Tags verändert werden. Die Methode des säurekatalysierten  $^{18}\text{O}$ -Labelings auf Peptidebene stellt somit eine leicht zu verwendende und kostengünstige Methode für das relative Quantifizieren von Proteinen und Peptiden nach Isotopenmarkierung auf Peptidebene dar.

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden unter Haaf und Schlosser (2012) veröffentlicht.



## 11 Abschließende Zusammenfassung und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, neue Erkenntnisse zu den Proteinen Period 1 und 2 zu erlangen. So wurden bei der Analyse des Immunopräzipitates von mPER1 und mPER2 mittels LC-MS nicht nur weitere bekannte Komponenten der circadianen Uhr, sondern auch verkürzte Varianten der Proteine identifiziert, bei denen es sich möglicherweise um alternative Splicevarianten handelt. Hier müssen jedoch weitere molekularbiologische Analysen zur Validierung der Ergebnisse der LC-MS-Analyse durchgeführt werden.

Nach der Optimierung der Phosphopeptidanreicherung mittels  $\text{TiO}_2$  und der anschließenden LC-MS-Analyse ist es außerdem gelungen, an den Proteinen Period 1 und 2 weitere Phosphorylierungsstellen zu den bislang bekannten zu identifizieren. Die gemeinsam mit Robert Gawlik und Andreas Schlosser entwickelte Software Pepview stellte dabei ein nützliches Werkzeug zur Visualisierung der gefundenen Phosphorylierungsstellen dar. Durch die Weiterentwicklung der Analytik konnten insbesondere mehrfach phosphorylierte Peptide besser analysiert werden. Es fällt jedoch bei bestimmten Phosphopeptiden, trotz des gewählten Ansatzes mit dem proteolytischen Verdau mit verschiedenen Proteasen und der LC-MS-Analyse mit CID und ETD, bislang immer noch schwer, alle Phosphorylierungen auf bestimmte Aminosäuren genau zu lokalisieren. Die mehrfach phosphorylierten Peptide weisen entgegen der Erwartungen meist relativ schlechte ETD-Fragmentspektren auf. Vermutlich macht die chemische Struktur der Phosphopeptide ein sogenanntes Soft-CID nach der ETD-Fragmentierung notwendig. Die verwendete ETD-Ionenfalle konnte dieses Soft-CID jedoch in vielen Fällen nicht durchführen, da im Gerät der Ladungszustand des Peptidions aufgrund der relativ niedrigen Auflösung der Ionenfalle nicht ermittelt werden konnte. Hier würde der Einsatz eines hochauflösenden ETD-Massenspektrometers sehr wahrscheinlich eine weitere Verbesserung der Analytik bringen. Gleichzeitig stellt die geringe Abundanz der Phosphopeptide, insbesondere der höher phosphorylierten Spezies und deren möglicher Verlust auf dem HPLC-System, weiterhin eine große Herausforderung dar. Dies gilt insbesondere für die Analyse der Positionsisomere der mehrfach phosphorylierten Peptide. Auch bei der Injektion mit einem Additiv wie der Zitronensäure, welche die Chromatographie der Phosphopeptide verbessert, ergeben hochphosphorylierte Peptide sehr breite Peaks bei der Elution von der  $\text{C}_{18}$ -Säule bei der LC-MS-Analyse.

An den Period Proteinen wurden im Rahmen der durchgeführten Analyse Phosphorylierungsstellen gefunden, welche im Bereich oder in der Nähe bekannter Interaktionsmotive und Bindungsdomänen der Proteine liegen und diese vermutlich in ihrer Aktivität beeinflussen. Es lassen sich jedoch aus den bisher gewonnenen qualitativen Daten keine

Aussagen über die genaue Funktion einzelner Phosphorylierungsstellen oder Phosphorylierungskuster treffen. Dafür wären neben der qualitativen Analyse der Phosphorylierung auch quantitative Analysen über die Änderungen der Phosphorylierung und der daraus resultierenden Effekte auf die Proteine notwendig.

Daher wurde versucht, einen Ansatz zur labelfreien Bestimmung des Phosphorylierungsgrades auf die bei der qualitativen Analyse der Phosphorylierung verwendete Methode, welche den proteolytischen Verdau mit verschiedenen Proteasen beinhaltet, zu übertragen. Es zeigte sich jedoch, dass diese Methode beim Proteinverdau durch verschiedene Proteasen zu abweichenden Ergebnissen für den Phosphorylierungsgrad führt, je nachdem welches Peptid für die Bestimmung verwendet wird. Dies lässt sich vermutlich auf die Beeinflussung der proteasekatalysierten Spaltung des Proteins zurückführen, welche durch die Phosphorylierung beeinträchtigt wird. So erwies sich diese Methode für den Einsatz an den Period-Proteinen, welche mehrere Phosphorylierungskuster besitzen, folglich als ungeeignet.

Aufgrund dieser Ergebnisse lag die Überlegung nahe, eine Methode zur Bestimmung der Phosphorylierungsgrades zu entwickeln, welche durch die Beeinflussung der Phosphorylierung auf den proteolytischen Verdau nicht beeinträchtigt wird. Das Konzept sah dabei drei Schritte der chemischen Modifizierung des Proteins vor. Im ersten Schritt sollten die freien Hydroxygruppen des Proteins verestert werden. Im zweiten Schritt sollte dann eine Hydrolyse der Phosphatgruppen erfolgen. Im letzten Schritt wiederum sollten die durch den Hydrolyseschritt neu entstandenen Hydroxygruppen mit einem isotope-labelierten Reagenz verestert werden. In der Theorie wäre das Resultat ein Protein, bei welchem sich die unphosphorylierte und die ehemals phosphorylierte Spezies nur durch das Isotopenlabel an der Stelle der ehemaligen Phosphorylierung unterscheiden. In der Praxis erwies es sich jedoch als äußerst schwer, die Veresterungsreaktionen selektiv und mit hoher Ausbeute durchzuführen. Daher konnte das Konzept nicht erfolgreich umgesetzt werden. Auch andere Varianten der chemischen Modifikation des Proteins wie zum Beispiel der  $\beta$ -Eliminierung konnten nicht zuverlässig für die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades angewandt werden. Bei den Versuchen wurde allerdings der Einbau von  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff an dem Carboxygruppen von Asparaginsäure, Glutaminsäure und dem C-Terminus der Testpeptide beobachtet.

Da sich die bisherigen Ansätze für die quantitative Analyse der Phosphorylierung der Period Proteine als ungeeignet erwiesen, wurde für die relative Quantifizierung der Phosphorylierung von mPER2 metabolisches Labeling mit  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff eingesetzt. Das Labeling mit  $^{15}\text{N}$ -Stickstoff wurde gewählt, da große Bereiche der Sequenz von mPER2 kein Lysin und Arginin enthalten, was eine Quantifizierung dieser Bereiche mit SILAC verhindert. Beim Versuch sollte der Einfluss der humanen *Serine/threonine-protein phosphatase 2A* (PP2A) auf den Phosphorylierungsstatus von mPER2 untersucht werden. Dabei war von Interesse, welche Phosphorylierungsstellen durch eine Überexpression von PP2A beeinflusst werden. Im Lauf der Versuche konnte eine Phosphorylierung am Threonin 959 von mPER2 identifiziert werden, welche vermutlich durch PP2A dephosphoryliert wird. Dieses Ergebnis muss allerdings noch durch weitere molekularbiologische Versuche validiert werden. Nachteilig am  $^{15}\text{N}$ -Labeling in Zellkultur mit humanen

HEK293-Zellen waren jedoch die sehr hohen Kosten für das isotoopenmarkierte Medium, welche umfassende Experimente sehr kostenintensiv machen.

Der bei den vorherigen Versuchen beobachtete Einbau von  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff an den Carboxygruppen wurde in weiteren Experimenten untersucht. Es stellte sich heraus, dass es sich dabei um einen säurekatalysierten Mechanismus der Substitutionsreaktion handelte. Daraufhin wurde versucht, die Reaktionsbedingungen soweit zu optimieren, dass dieser Austausch für ein säurekatalysiertes Isotoopenlabeling auf Peptidebene verwendbar ist. Nach anfänglichen Problemen in Bezug auf die Vollständigkeit der Isotoopenmarkierung und in Bezug auf milde Reaktionsbedingungen konnten diese Probleme durch den Einsatz von Salzsäure in  $^{18}\text{O}$ -Wasser in Kombination mit einer Trocknung durch wasserfreien Stickstoff minimiert werden. Die Methode bietet eine kostengünstige und robuste Alternative zu bisherigen Methoden der Isotoopenmarkierung auf Peptidebene. Sie bietet sich daher für weitere Experimente zur Funktionsaufklärung der verschiedenen Phosphorylierungsstellen der Period-Proteine an.

Die qualitative und quantitative Analyse von Phosphoproteinen mittels LC-MS bleibt ein anspruchsvolles Feld im Bereich der Proteomics. Wenn es gelänge, eine Methode zu entwickeln, welche die Phosphatgruppe für die Analyse durch eine Isotoopenmarkierung ersetzt, würde dies die Analyse mittels LC-MS erheblich vereinfachen.

In Hinblick auf das Verständnis der Phosphorylierung für die Funktionsweise der circadianen Uhr stellen sich jedoch noch mehrere Herausforderungen. So ist vermutlich die Sensitivität der bislang verwendeten Methoden zu gering, um entsprechende Messungen auch an den nativen Period-Proteinen zuverlässig durchführen zu können. Die nativ in der Zelle exprimierten Proteine kommen in wesentlich geringeren Mengen in der Zelle vor, als die überexprimierten Period-Proteine, an welchen die Messungen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Zudem ist wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung im Zellkern und im Cytoplasma separat analysiert werden muss, um die funktionelle Bedeutung einzelner Phosphorylierungsstellen zu entschlüsseln.



# Literaturverzeichnis

- Ahrends, R., Pieper, S., Kuhn, A., Weisshoff, H., Hamester, M., Lindemann, T., Scheller, C., Lehmann, K., Taubner, K. und Linscheid, M. W.: A Metal-Coded Affinity tag Approach to Quantitative Proteomics. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 6(11):S. 1907–1916, 2007.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T. und Nishida, E.: Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I Epsilon (CKI Epsilon) and CKI Delta in Cultured Cells. In: *Molecular and Cellular Biology*, Band 22(6):S. 1693–1703, 2002.
- Alpert, A. J.: Hydrophilic-Interaction Chromatography for the Separation of Peptides, Nucleic-Acids and Other Polar Compounds. In: *Journal of Chromatography*, Band 499:S. 177–196, 1990.
- Anderson, N. L. und Anderson, N. G.: Proteome and Proteomics: New Technologies, new Concepts, and new Words. In: *Electrophoresis*, Band 19(11):S. 1853–1861, 1998.
- Andersson, L.: Recognition of Phosphate Groups by Immobilized Aluminum(III) Ions. In: *Journal of Chromatography*, Band 539(2):S. 327–334, 1991.
- Andersson, L. und Porath, J.: Isolation of Phosphoproteins by Immobilized Metal (Fe-3+) Affinity-Chromatography. In: *Analytical Biochemistry*, Band 154(1):S. 250–254, 1986.
- Apweiler, R., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alam-Faruque, Y., Antunes, R., Barrell, D., Bely, B., Bingley, M., Binns, D., Bower, L., Browne, P., Chan, W. M., Dimmer, E., Eberhardt, R., Fazzini, F., Fedotov, A., Foulger, R., Garavelli, J., Castro, L. G., Huntley, R., Jacobsen, J., Kleen, M., Laiho, K., Legge, D., Lin, Q. A., Liu, W. D., Luo, J., Orchard, S., Patient, S., Pichler, K., Poggioli, D., Pontikos, N., Pruess, M., Rosanoff, S., Sawford, T., Sehra, H., Turner, E., Corbett, M., Donnelly, M., van Rensburg, P., Xenarios, I., Bougueleret, L., Auchincloss, A., Argoud-Puy, G., Axelsen, K., Bairoch, A., Baratin, D., Blatter, M. C., Boeckmann, B., Bolleman, J., Bollondi, L., Boutet, E., Quintaje, S. B., Breuza, L., Bridge, A., deCastro, E., Couder, E., Cusin, I., Doche, M., Dornevil, D., Duvaud, S., Estreicher, A., Famiglietti, L., Feuermann, M., Gehant, S., Ferro, S., Gasteiger, E., Gateau, A., Gerritsen, V., Gos, A., Gruaz-Gumowski, N., Hinz, U., Hulo, C., Hulo, N., James, J., Jimenez, S., Jungo, F., Kappler, T., Keller, G., Lara, V., Lemereier, P., Lieberherr, D., Martin, X., Masson, P., Moinat, M., Morgat, A., Paesano, S., Pedruzzi, I., Pilboud, S., Poux, S., Pozzato, M., Redaschi, N., Rivoire, C., Roechert, B., Schneider, M., Sigrist, C.,

- Sonesson, K., Staehli, S., Stanley, E. et al.: Ongoing and Future Developments at the Universal Protein Resource. In: *Nucleic Acids Research*, Band 39:S. D214–D219, 2011.
- Bae, K., Jin, X. W., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M. und Weaver, D. R.: Differential Functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN Circadian Clock. In: *Neuron*, Band 30(2):S. 525–536, 2001.
- Ballif, B. A., Villen, J., Beausoleil, S. A., Schwartz, D. und Gygi, S. P.: Phosphoproteomic Analysis of the Developing Mouse Brain. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 3(11):S. 1093–1101, 2004.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. und Kuster, B.: Quantitative Mass Spectrometry in Proteomics: a Critical Review. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Band 389(4):S. 1017–1031, 2007.
- Barnidge, D. R., Dratz, E. A., Martin, T., Bonilla, L. E., Moran, L. B. und Lindall, A.: Absolute Quantification of the G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin by LC/MS/MS Using Proteolysis Product Peptides and Synthetic Peptide Standards. In: *Analytical Chemistry*, Band 75(3):S. 445–451, 2003.
- Beardsley, R. L. und Reilly, J. P.: Optimization of Guanidination Procedures for MALDI Mass Mapping. In: *Analytical Chemistry*, Band 74(8):S. 1884–1890, 2002.
- Beausoleil, S. A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J. E., Villen, J., Li, J. X., Cohn, M. A., Cantley, L. C. und Gygi, S. P.: Large-scale Characterization of HeLa Cell Nuclear Phosphoproteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 101(33):S. 12130–12135, 2004.
- Becker, J. S., Boulyga, S. F., Pickhardt, C., Becker, J., Buddrus, S. und Przybylski, M.: Determination of Phosphorus in Small Amounts of Protein Samples by ICP-MS. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Band 375(4):S. 561–566, 2003.
- Bender, M. L. und Kemp, K. C.: Oxygen-18 Studies of the Mechanism of the Alpha-Chymotrypsin-Catalyzed Hydrolysis of Esters. In: *Journal of the American Chemical Society*, Band 79(1):S. 111–116, 1957.
- Biemann, K.: Nomenclature for Peptide Fragment Ions (Positive-Ions). In: *Methods in Enzymology*, Band 193:S. 886–887, 1990.
- Blackstock, W. P. und Weir, M. P.: Proteomics: Quantitative and Physical Mapping of Cellular Proteins. In: *Trends in Biotechnology*, Band 17(3):S. 121–127, 1999.
- Blume-Jensen, P. und Hunter, T.: Oncogenic Kinase Signalling. In: *Nature*, Band 411(6835):S. 355–365, 2001.
- Bodenmiller, B., Mueller, L. N., Mueller, M., Domon, B. und Aebersold, R.: Reproducible Isolation of Distinct, Overlapping Segments of the Phosphoproteome. In: *Nature Methods*, Band 4(3):S. 231–237, 2007.



- Bondarenko, P. V., Chelius, D. und Shaler, T. A.: Identification and Relative Quantitation of Protein Mixtures by Enzymatic Digestion Followed by Capillary Reversed-Phase Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. In: *Analytical Chemistry*, Band 74(18):S. 4741–4749, 2002.
- Byford, M. F.: Rapid and Selective Modification of Phosphoserine Residues Catalysed by Ba<sup>2+</sup> Ions for their Detection During Peptide Microsequencing. In: *Biochemical Journal*, Band 280:S. 261–265, 1991.
- Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D. M., Patel, K., Khorkova, O., Styren, S., Morse, B., Yao, Z. und Keesler, G. A.: Human Casein Kinase I Delta Phosphorylation of Human Circadian Clock Proteins Period 1 and 2. In: *FEBS Letters*, Band 489(2-3):S. 159–165, 2001.
- Cantin, G. T., Shock, T. R., Park, S. K., Madhani, H. D. und Yates, J. R.: Optimizing TiO<sub>2</sub>-Based Phosphopeptide Enrichment for Automated Multidimensional Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. In: *Analytical Chemistry*, Band 79(12):S. 4666–4673, 2007.
- Capelo, J. L., Carreira, R. J., Fernandes, L., Lodeiro, C., Santos, H. M. und Simal-Gandara, J.: Latest Developments in Sample Treatment for O-18-Isotopic Labeling for Proteomics Mass Spectrometry-based Approaches: A Critical Review. In: *Talanta*, Band 80(4):S. 1476–1486, 2010.
- Clevenger, C. V.: Roles and Regulation of Stat Family Transcription Factors in Human Breast Cancer. In: *American Journal of Pathology*, Band 165(5):S. 1449–1460, 2004.
- Cohen, P.: The Origins of Protein Phosphorylation. In: *Nature Cell Biology*, Band 4(5):S. E127–E130, 2002.
- Cohen, S. A. und Strydom, D. J.: Amino-Acid Analysis Utilizing Phenylisothiocyanate Derivatives. In: *Analytical Biochemistry*, Band 174(1):S. 1–16, 1988.
- Collins, M. O., Yu, L. und Choudhary, J. S.: Analysis of Protein Phosphorylation on a Proteome-Scale. In: *Proteomics*, Band 7(16):S. 2751–2768, 2007.
- Cravatt, B. F., Simon, G. M. und Yates, J. R.: The Biological Impact of Mass-Spectrometry-Based Proteomics. In: *Nature*, Band 450(7172):S. 991–1000, 2007.
- Creese, A. J. und Cooper, H. J.: The Effect of Phosphorylation on the Electron Capture Dissociation of Peptide Ions. In: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, Band 19(9):S. 1263–1274, 2008.
- Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R. und Sanchez, J. C.: Relative Quantification of Proteins in Human Cerebrospinal Fluids by MS/MS Using 6-Plex Isobaric Tags. In: *Analytical Chemistry*, Band 80(8):S. 2921–2931, 2008.

- DeBruyne, J. P., Weaver, D. R. und Reppert, S. M.: CLOCK and NPAS2 have Overlapping Roles in the Suprachiasmatic Circadian Clock. In: *Nature Neuroscience*, Band 10(5):S. 543–545, 2007.
- DeGnore, J. P. und Qin, J.: Fragmentation of Phosphopeptides in an Ion Trap Mass Spectrometer. In: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, Band 9(11):S. 1175–1188, 1998.
- Desiderio, D. M. und Kai, M.: Preparation of Stable Isotope-Incorporated Peptide Internal Standards for Field Desorption Mass-Spectrometry Quantification of Peptides in Biologic Tissue. In: *Biomedical Mass Spectrometry*, Band 10(8):S. 471–479, 1983.
- Douglas, D. J., Frank, A. J. und Mao, D. M.: Linear Ion Traps in Mass Spectrometry. In: *Mass Spectrometry Reviews*, Band 24(1):S. 1–29, 2005.
- Dunn, J. D., Reid, G. E. und Bruening, M. L.: Techniques for Phosphopeptide Enrichment Prior to Analysis by Mass Spectrometry. In: *Mass Spectrometry Reviews*, Band 29(1):S. 29–54, 2010.
- Ebisawa, T.: Circadian Rhythms in the CNS and Peripheral Clock Disorders: Human Sleep Disorders and Clock Genes. In: *Journal of Pharmacological Sciences*, Band 103(2):S. 150–154, 2007.
- Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N., Mishima, K., Kamei, Y., Katoh, M., Watanabe, T., Sekimoto, M., Shibui, K., Kim, K., Kudo, Y., Ozeki, Y., Sugishita, M., Toyoshima, R., Inoue, Y., Yamada, N., Nagase, T., Ozaki, N., Ohara, O., Ishida, N., Okawa, M., Takahashi, K. und Yamauchi, T.: Association of Structural Polymorphisms in the Human Period3 Gene with Delayed Sleep Phase Syndrome. In: *Embo Reports*, Band 2(4):S. 342–346, 2001.
- Eide, E. J., Woolf, M. F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E. L., Giovanni, A. und Virshup, D. M.: Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKI Epsilon-Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. In: *Molecular and Cellular Biology*, Band 25(7):S. 2795–2807, 2005.
- Elliott, M. H., Smith, D. S., Parker, C. E. und Borchers, C.: Current Trends in Quantitative Proteomics. In: *Journal of Mass Spectrometry*, Band 44(12):S. 1637–1660, 2009.
- Eng, J. K., McCormack, A. L. und Yates, J. R.: An Approach to Correlate Tandem Mass-Spectral Data of Peptides with Amino-Acid-Sequences in a Protein Database. In: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, Band 5(11):S. 976–989, 1994.
- Eyrich, B., Sickmann, A. und Zahedi, R. P.: Catch me if you can: Mass Spectrometry-based Phosphoproteomics and Quantification Strategies. In: *Proteomics*, Band 11(4):S. 554–570, 2011.

- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. und Whitehouse, C. M.: Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. In: *Science*, Band 246(4926):S. 64–71, 1989.
- Fenselau, C., Yao, X. D., Freas, A., Ramirez, J. und Demirev, P. A.: Proteolytic O-18 Labeling for Comparative Proteomics: Model Studies with two Serotypes of Adenovirus. In: *Analytical Chemistry*, Band 73(13):S. 2836–2842, 2001.
- Ficarro, S. B., Parikh, J. R., Blank, N. C. und Marto, J. A.: Niobium(v) Oxide (nb2o5): Application to Phosphoproteomics. In: *Analytical Chemistry*, Band 80(12):S. 4606–4613, 2008.
- Frank, E., Kessler, M. S., Filiou, M. D., Zhang, Y. Y., Maccarrone, G., Reckow, S., Bunck, M., Heumann, H., Turck, C. W., Landgraf, R. und Hambsch, B.: Stable Isotope Metabolic Labeling with a Novel (15)N-Enriched Bacteria Diet for Improved Proteomic Analyses of Mouse Models for Psychopathologies. In: *Plos One*, Band 4(11), 2009.
- Gallego, M., Kang, H. und Virshup, D. M.: Protein Phosphatase 1 Regulates the Stability of the Circadian Protein PER2. In: *Biochemical Journal*, Band 399:S. 169–175, 2006.
- Gallego, M. und Virshup, D. M.: Post-Translational Modifications Regulate the Ticking of the Circadian Clock. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Band 8(2):S. 139–148, 2007.
- Gao, J., Opiteck, G. J., Friedrichs, M. S., Dongre, A. R. und Hefta, S. A.: Changes in the Protein Expression of Yeast as a Function of Carbon Source. In: *Journal of Proteome Research*, Band 2(6):S. 643–649, 2003.
- Garaleh, M., Lahcini, M., Kricheldorf, H. R. und Weidner, S. M.: Syntheses of Aliphatic Polyesters Catalyzed by Lanthanide Triflates. In: *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, Band 47(1):S. 170–177, 2009.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S. und Weitz, C. J.: Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. In: *Science*, Band 280(5369):S. 1564–1569, 1998.
- Gerber, S. A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M. W. und Gygi, S. P.: Absolute Quantification of Proteins and Phosphoproteins from Cell Lysates by Tandem MS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 100(12):S. 6940–6945, 2003.
- Gevaert, K., Staes, A., Demol, H., Van Damme, J., Martens, L. und Vandekerckhove, J.: Global Differential Non-Gel Proteomics by Quantitative and Stable Labeling of Tryptic Peptides with Oxygen-18. In: *Journal of Proteome Research*, Band 3(4):S. 786–791, 2004.
- Gómez-Tagle, P. und Yatsimirsky, A. K.: Phosphodiester Hydrolysis by Lanthanide Complexes of Bis-Tris Propane. In: *Inorganic Chemistry*, Band 40(15):S. 3786–3796, 2001.

- Gnad, F., Ren, S. B., Cox, J., Olsen, J. V., Macek, B., Oroshi, M. und Mann, M.: PHOSIDA (Phosphorylation Site Database): Management, Structural and Evolutionary Investigation, and Prediction of Phosphosites. In: *Genome Biology*, Band 8(11), 2007.
- Good, D. M., Wirtala, M., McAlister, G. C. und Coon, J. J.: Performance Characteristics of Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 6(11):S. 1942–1951, 2007.
- Goshe, M. B., Conrads, T. P., Panisko, E. A., Angell, N. H., Veenstra, T. D. und Smith, R. D.: Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses. In: *Analytical Chemistry*, Band 73(11):S. 2578–2586, 2001.
- Gruhler, A., Schulze, W. X., Matthiesen, R., Mann, M. und Jensen, O. N.: Stable Isotope Labeling of Arabidopsis Thaliana Cells and Quantitative Proteomics by Mass Spectrometry. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 4(11):S. 1697–1709, 2005.
- Gygi, S. P. und Aebersold, R.: Mass Spectrometry and Proteomics. In: *Current Opinion in Chemical Biology*, Band 4(5):S. 489–494, 2000.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H. und Aebersold, R.: Quantitative Analysis of Complex Protein Mixtures using Isotope-Coded Affinity Tags. In: *Nature Biotechnology*, Band 17(10):S. 994–999, 1999.
- Haaf, E. und Schlosser, A.: Peptide and Protein Quantitation by Acid-Catalyzed  $^{18}\text{O}$ -Labeling of Carboxyl Groups. In: *Analytical Chemistry*, Band 84(1):S. 304–311, 2012.
- Han, G. H., Ye, M. L., Zhou, H. J., Jiang, X. N., Feng, S., Jiang, X. G., Tian, R. J., Wan, D. F., Zou, H. F. und Gu, J. R.: Large-scale Phosphoproteome Analysis of Human Liver Tissue by Enrichment and Fractionation of Phosphopeptides with Strong Anion Exchange Chromatography. In: *Proteomics*, Band 8(7):S. 1346–1361, 2008.
- Hanke, S., Besir, H., Oesterhelt, D. und Mann, M.: Absolute SILAC for Accurate Quantitation of Proteins in Complex Mixtures down to the Attomole Level. In: *Journal of Proteome Research*, Band 7(3):S. 1118–1130, 2008.
- Hansen, K. C., Schmitt-Ulms, G., Chalkley, R. J., Hirsch, J., Baldwin, M. A. und Burlingame, A. L.: Mass Spectrometric Analysis of Protein Mixtures at Low Levels Using Cleavable C-13-Isotope-Coded Affinity Tag and Multidimensional Chromatography. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 2(5):S. 299–314, 2003.
- Heller, M., Mattou, H., Menzel, C. und Yao, X. D.: Trypsin Catalyzed O-16-to-O-18 Exchange for Comparative Proteomics: Tandem Mass Spectrometry Comparison using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-Ion Trap Mass Spectrometers. In: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, Band 14(7):S. 704–718, 2003.

- Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C. und Watanabe, C.: Identifying Proteins from 2-Dimensional Gels by Molecular Mass Searching of Peptide-Fragments in Protein-Sequence Databases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 90(11):S. 5011–5015, 1993.
- Higgins, D. G., Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D. und Gibson, T. J.: Clustal W and Clustal X Version 2.0. In: *Bioinformatics*, Band 23(21):S. 2947–2948, 2007.
- Hirota, T., Lee, J. W., Lewis, W. G., Zhang, E. E., Breton, G., Liu, X. Z., Garcia, M., Peters, E. C., Etchegaray, J. P., Traver, D., Schultz, P. G. und Kay, S. A.: High-Throughput Chemical Screen Identifies a Novel Potent Modulator of Cellular Circadian Rhythms and Reveals CKI Alpha as a Clock Regulatory Kinase. In: *PLoS Biology*, Band 8(12), 2010.
- Höfle, G., Steglich, W. und Vorbrüggen, H.: 4-Dialkylaminopyridine als Hochwirksame Acylierungskatalysatoren. In: *Angewandte Chemie*, Band 90:S. 602–615, 1978.
- Hubbard, M. J. und Cohen, P.: On Target with a New Mechanism for the Regulation of Protein-Phosphorylation. In: *Trends in Biochemical Sciences*, Band 18(5):S. 172–177, 1993.
- Huddleston, M. J., Amman, R. S., Bean, M. F. und Carr, S. A.: Selective Detection of Phosphopeptides in Complex-Mixtures by Electrospray Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry. In: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, Band 4(9):S. 710–717, 1993.
- Hughes, W. L., Saroff, H. A. und Carney, A. L.: Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. xxii. a Crystallizable Guanidinated Derivative of Human Serum Albumin. In: *Journal of the American Chemical Society*, Band 71(7):S. 2476–2480, 1949.
- Hunter, T.: Protein-Kinases and Phosphatases - the Yin and Yang of Protein-Phosphorylation and Signaling. In: *Cell*, Band 80(2):S. 225–236, 1995.
- Hunter, T.: Signaling - 2000 and Beyond. In: *Cell*, Band 100(1):S. 113–127, 2000.
- Huttlin, E. L., Jedrychowski, M. P., Elias, J. E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S. A., Villen, J., Haas, W., Sowa, M. E. und Gygi, S. P.: A Tissue-Specific Atlas of Mouse Protein Phosphorylation and Expression. In: *Cell*, Band 143(7):S. 1174–1189, 2010.
- Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T. und Ishida, N.: A Role for Glycogen Synthase Kinase-3 Beta in the Mammalian Circadian Clock. In: *Journal of Biological Chemistry*, Band 280(33):S. 29397–29402, 2005.

- Iranpoor, N. und Shekarriz, M.: Catalytic Esterification of Alcohols, Carboxylic Acids and Transesterification Reactions with Cerium(IV) Triflate. In: *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Band 72:S. 455–458, 1999.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J. und Mann, M.: Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of Absolute Protein Amount in Proteomics by the Number of Sequenced Peptides per Protein. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 4(9):S. 1265–1272, 2005.
- James, P., Quadroni, M., Carafoli, E. und Gonnet, G.: Protein Identification by Mass Profile Fingerprinting. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Band 195(1):S. 58–64, 1993.
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F. und Higgins, D. G.: The CLUSTAL\_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. In: *Nucleic Acids Research*, Band 25(24):S. 4876–4882, 1997.
- Jensen, O. N.: Interpreting the Protein Language using Proteomics. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Band 7(6):S. 391–403, 2006.
- Jensen, S. S. und Larsen, M. R.: Evaluation of the Impact of some Experimental Procedures on Different Phosphopeptide Enrichment Techniques. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Band 21(22):S. 3635–3645, 2007.
- Jin, W. H., Dai, J., Zhou, H., Xia, Q. C., Zou, H. F. und Zeng, R.: Phosphoproteome Analysis of Mouse Liver using Immobilized Metal Affinity Purification and Linear Ion Trap Mass Spectrometry. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Band 18(18):S. 2169–2176, 2004.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. und Hillenkamp, F.: Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption of Nonvolatile Compounds. In: *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, Band 78:S. 53–68, 1987.
- Keesler, G. A., Camacho, F., Guo, Y., Virshup, D., Mondadori, C. und Yao, Z. B.: Phosphorylation and Destabilization of Human Period I Clock Protein by Human Casein Kinase I Epsilon. In: *Neuroreport*, Band 11(5):S. 951–955, 2000.
- Krijgsveld, J., Ketting, R. F., Mahmoudi, T., Johansen, J., Artal-Sanz, M., Verrijzer, C. P., Plasterk, R. H. A. und Heck, A. J. R.: Metabolic Labeling of C-Elegans and D-Melanogaster for Quantitative Proteomics. In: *Nature Biotechnology*, Band 21(8):S. 927–931, 2003.
- Kruger, M., Moser, M., Ussar, S., Thievensen, I., Lubner, C. A., Forner, F., Schmidt, S., Zanivan, S., Fassler, R. und Mann, M.: SILAC Mouse for Quantitative Proteomics Uncovers Kindlin-3 as an Essential Factor for Red Blood Cell Function. In: *Cell*, Band 134(2):S. 353–364, 2008.

- Kubinyi, H.: Calculation of Isotope Distributions in Mass-Spectrometry - a Trivial Solution for a Nontrivial Problem. In: *Analytica Chimica Acta*, Band 247(1):S. 107–119, 1991.
- Kuchma, M. H., Komanski, C. B., Colon, J., Teblum, A., Masunov, A. E., Alvarado, B., Babu, S., Seal, S., Summy, J. und Baker, C. H.: Phosphate Ester Hydrolysis of Biologically Relevant Molecules by Cerium Oxide Nanoparticles. In: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Band 6(6):S. 738–744, 2010.
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X. W., Maywood, E. S., Hastings, M. H. und Reppert, S. M.: mCRY1 and mCRY2 are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. In: *Cell*, Band 98(2):S. 193–205, 1999.
- Kuyama, H., Toda, C., Watanabe, M., Tanaka, K. und Nishimura, O.: An Efficient Chemical Method for Dephosphorylation of Phosphopeptides. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Band 17(13):S. 1493–1496, 2003.
- Kweon, H. K. und Hakansson, K.: Selective Zirconium Dioxide-based Enrichment of Phosphorylated Peptides for Mass Spectrometric Analysis. In: *Analytical Chemistry*, Band 78(6):S. 1743–1749, 2006.
- LaCourse, W. R.: Column Liquid Chromatography: Equipment and Instrumentation. In: *Analytical Chemistry*, Band 74(12):S. 2813–2831, 2002.
- Lange, V., Malmstrom, J. A., Didion, J., King, N. L., Johansson, B. P., Schafer, J., Rameseder, J., Wong, C. H., Deutsch, E. W., Brusniak, M. Y., Buhlmann, P., Bjorck, L., Domon, B. und Aebersold, R.: Targeted Quantitative Analysis of Streptococcus Pyogenes Virulence Factors by Multiple Reaction Monitoring. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 7(8):S. 1489–1500, 2008.
- Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P. und Jorgensen, T. J. D.: Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides from Peptide Mixtures using Titanium Dioxide Microcolumns. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 4(7):S. 873–886, 2005.
- Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R. A., Loudon, A. S. I. und Reppert, S. M.: Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. In: *Cell*, Band 107(7):S. 855–867, 2001.
- Lee, H. M., Chen, R. M., Kim, H., Etchegaray, J. P., Weaver, D. R. und Lee, C.: The Period of the Circadian Oscillator is Primarily Determined by the Balance Between Casein Kinase 1 and Protein Phosphatase 1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 108(39):S. 16451–16456, 2011.
- Lehmann, W. D.: *Protein Phosphorylation Analysis by Electrospray Mass Spectrometry*, Band 1. The Royal Society of Chemistry, erste Auflage, 2010.

- Lehmann, W. D. und Schlosser, A.: Peptide and Protein Analysis with Electrospray Tandem Mass Spectrometry. In: Wink, M. (Hg.) *An Introduction to Molecular Biotechnology: Fundamentals, Methods and Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, S. 119–130. Zweite Auflage, 2011.
- Lemeer, S. und Heck, A. J. R.: The Phosphoproteomics Data Explosion. In: *Current Opinion in Chemical Biology*, Band 13(4):S. 414–420, 2009.
- Litvinenko, L. M. und Kirichenko, A. I.: Role of Basicity and Steric Factors in Nucleophilic Catalysis by Tertiary Amines. In: *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, Band 176:S. 763, 1967.
- Liu, H. B., Sadygov, R. G. und Yates, J. R.: A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. In: *Analytical Chemistry*, Band 76(14):S. 4193–4201, 2004.
- Liu, N., Wu, H. Z., Liu, H. X., Chen, G. N. und Cai, Z. W.: Microwave-Assisted O-18-Labeling of Proteins Catalyzed by Formic Acid. In: *Analytical Chemistry*, Band 82(21):S. 9122–9126, 2010.
- Luedtke, N. W. und Schepartz, A.: Lanthanide-Mediated Phosphoester Hydrolysis and Phosphate Elimination from Phosphopeptides. In: *Chemical Communications*, Band 41(43):S. 5426, 2005.
- Maccarrone, G., Kolb, N., Teplytska, L., Birg, I., Zollinger, R., Holsboer, F. und Turck, C. W.: Phosphopeptide Enrichment by IEF. In: *Electrophoresis*, Band 27(22):S. 4585–4595, 2006.
- Maiolica, A., Borsotti, D. und Rappsilber, J.: Self-made Frits for Nanoscale Columns in Proteomics. In: *Proteomics*, Band 5(15):S. 3847–3850, 2005.
- Maldonado, A. L. und Yatsimirsky, A. K.: Kinetics of Phosphodiester Cleavage by Differentyl Generated Cerium(iv) Hydroxo Species in Neutral Solutions. In: *Organic & Biomolecular Chemistry*, Band 3:S. 2859–2867, 2005.
- Mann, M.: Functional and Quantitative Proteomics using SILAC. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Band 7(12):S. 952–958, 2006.
- Mann, M., Hojrup, P. und Roepstorff, P.: Use of Mass-Spectrometric Molecular-Weight Information to Identify Proteins in Sequence Databases. In: *Biological Mass Spectrometry*, Band 22(6):S. 338–345, 1993.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. und Sudarsanam, S.: The Protein Kinase Complement of the Human Genome. In: *Science*, Band 298(5600):S. 1912–+, 2002.
- Martensen, T. M.: Chemical-Properties, Isolation, and Analysis of O-Phosphates in Proteins. In: *Methods in Enzymology*, Band 107:S. 3–23, 1984.



- Martin, D. B., Eng, J. K., Nesvizhskii, A. I., Gemmill, A. und Aebersold, R.: Investigation of Neutral Loss During Collision-Induced Dissociation of Peptide Ions. In: *Analytical Chemistry*, Band 77(15):S. 4870–4882, 2005.
- Mazanek, M., Mituloviae, G., Herzog, F., Stingl, C., Hutchins, J. R. A., Peters, J. M. und Mechtler, K.: Titanium Dioxide as a Chemo-Affinity Solid Phase in Offline Phosphopeptide Chromatography prior to HPLC-MS/MS Analysis. In: *Nature Protocols*, Band 2(5):S. 1059–U1, 2007.
- Mazanek, M., Roitinger, E., Hudecz, O., Hutchins, J. R. A., Hegemann, B., Mitulovic, G., Taus, T., Stingl, C., Peters, J. M. und Mechtler, K.: A New Acid Mix Enhances Phosphopeptide Enrichment on Titanium- and Zirconium Dioxide for Mapping of Phosphorylation Sites on Protein Complexes. In: *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Band 878(5-6):S. 515–524, 2010.
- McClatchy, D. B., Dong, M. Q., Wu, C. C., Venable, J. D. und Yates, J. R.: N-15 Metabolic Labeling of Mammalian Tissue with Slow Protein Turnover. In: *Journal of Proteome Research*, Band 6(5):S. 2005–2010, 2007.
- McNulty, D. E. und Annan, R. S.: Hydrophilic Interaction Chromatography Reduces the Complexity of the Phosphoproteome and Improves Global Phosphopeptide Isolation and Detection. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 7(5):S. 971–980, 2008.
- Mears, W. H. und Sobotka, H.: Heavy Oxygen Exchange Reactions of Proteins and Amino Acids. In: *Journal of the American Chemical Society*, Band 61(4):S. 880–886, 1939.
- Medrano, F., Calderón, A. und Yatsimirsky, A. K.: Unusually High Phosphodiesterolytic Activity of La(III) Hydroxide Complexes Stabilized by Glycine Derivatives. In: *Chemical Communications*, Band 39(15):S. 1968, 2003.
- Meyer, H. E., Hoffmann-Posorske, E., Korte, H. und Heilmeyer, L. M.G., Jr: Sequence Analysis of Phosphoserine-Containing Peptides: Modification for Picomolar Sensitivity. In: *FEBS Letters*, Band 204(1):S. 61–66, 1986.
- Mikesh, L. M., Ueberheide, B., Chi, A., Coon, J. J., Syka, J. E. P., Shabanowitz, J. und Hunt, D. F.: The utility of etd mass spectrometry in proteomic analysis. In: *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, Band 1764(12):S. 1811–1822, 2006.
- Miyagi, M. und Rao, K. C. S.: Proteolytic O-18-Labeling Strategies for Quantitative Proteomics. In: *Mass Spectrometry Reviews*, Band 26(1):S. 121–136, 2007.
- Miyazaki, K., Mesaki, M. und Ishida, N.: Nuclear Entry Mechanism of Rat PER2 (rPER2): Role of rPER2 in Nuclear Localization of CRY Protein. In: *Molecular and Cellular Biology*, Band 21(19):S. 6651–6659, 2001.

- Molina, H., Matthiesen, R., Kandasamy, K. und Pandey, A.: Comprehensive Comparison of Collision Induced Dissociation and Electron Transfer Dissociation. In: *Analytical Chemistry*, Band 80(13):S. 4825–4835, 2008.
- Morris, H. R., Paxton, T., Dell, A., Langhorne, J., Berg, M., Bordoli, R. S., Hoyes, J. und Bateman, R. H.: High Sensitivity Collisionally-Activated Decomposition Tandem Mass Spectrometry on a Novel Quadrupole/Orthogonal-Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometer. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Band 10(8):S. 889–896, 1996.
- Mueller, M., Martens, L. und Apweiler, R.: Annotating the Human Proteome: Beyond Establishing a Parts List. In: *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, Band 1774(2):S. 175–191, 2007.
- Murphy, R. C. und Clay, K. L.: Synthesis and Back Exchange of O-18 Labeled Amino Acids for Use as Internal Standards with Mass-Spectrometry. In: *Biomedical Mass Spectrometry*, Band 6(7):S. 309–314, 1979.
- Murphy, R. C. und Clay, K. L.: Preparation of Labeled Molecules by Exchange with O-18 Water. In: *Methods in Enzymology*, Band 193:S. 338–348, 1990.
- Nelson, C. J., Huttlin, E. L., Hegeman, A. D., Harms, A. C. und Sussman, M. R.: Implications of <sup>15</sup>N-Metabolic Labeling for Automated Peptide Identification in Arabidopsis Thaliana. In: *Proteomics*, Band 7(8):S. 1279–92, 2007.
- Niles, R., Witkowska, H. E., Allen, S., Hall, S. C., Fisher, S. J. und Hardt, M.: Acid-Catalyzed Oxygen-18 Labeling of Peptides. In: *Analytical Chemistry*, Band 81(7):S. 2804–9, 2009.
- Oda, Y., Huang, K., Cross, F. R., Cowburn, D. und Chait, B. T.: Accurate Quantitation of Protein Expression and Site-Specific Phosphorylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 96(12):S. 6591–6596, 1999.
- Oishi, K., Fukui, H. und Ishida, N.: Rhythmic Expression of BMAL1 mRNA is Altered in Clock Mutant Mice: Differential Regulation in the Suprachiasmatic Nucleus and Peripheral Tissues. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Band 268(1):S. 164–171, 2000.
- Old, W. M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K. G., Mendoza, A., Sevinsky, J. R., Resing, K. A. und Ahn, N. G.: Comparison of Label-Free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 4(10):S. 1487–1502, 2005.
- Olsen, J. V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M. L., Jensen, L. J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T. S., Nigg, E. A., Brunak, S. und Mann, M.: Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy During Mitosis. In: *Science Signaling*, Band 3(104), 2010.

- Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. und Mann, M.: Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 1(5):S. 376–386, 2002.
- Ong, S. E., Kratchmarova, I. und Mann, M.: Properties of C-13-Substituted Arginine in Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). In: *Journal of Proteome Research*, Band 2(2):S. 173–181, 2003.
- Ong, S. E. und Mann, M.: Mass Spectrometry-Based Proteomics turns Quantitative. In: *Nature Chemical Biology*, Band 1(5):S. 252–262, 2005.
- Ong, S. E. und Mann, M.: A Practical Recipe for Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC). In: *Nature Protocols*, Band 1(6):S. 2650–2660, 2006.
- Orita, A., Tanahashi, C., Kakuda, A. und Otera, J.: Highly Efficient and Versatile Acylation of Alcohols with Bi(otf)(3) as Catalyst. In: *Angewandte Chemie-International Edition*, Band 39(16):S. 2877–2879, 2000.
- Pandey, A., Fernandez, M. M., Steen, H., Blagoev, B., Nielsen, M. M., Roche, S., Mann, M. und Lodish, H. F.: Identification of a novel immunoreceptor tyrosine-based activation motif-containing molecule, *stam2*, by mass spectrometry and its involvement in growth factor and cytokine receptor signaling pathways. In: *Journal of Biological Chemistry*, Band 275(49):S. 38633–38639, 2000a.
- Pandey, A., Podtelejnikov, A. V., Blagoev, B., Bustelo, X. R., Mann, M. und Lodish, H. F.: Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: Identification of *vav-2* as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 97(1):S. 179–184, 2000b.
- Pappin, D. J. C., Hojrup, P. und Bleasby, A. J.: Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting. In: *Current Biology*, Band 3(6):S. 327–332, 1993.
- Partch, C. L., Shields, K. F., Thompson, C. L., Selby, C. P. und Sancar, A.: Posttranslational Regulation of the Mammalian Circadian Clock by Cryptochrome and Protein Phosphatase 5. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 103(27):S. 10467–10472, 2006.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M. und Cottrell, J. S.: Probability-Based Protein Identification by Searching Sequence Databases using Mass Spectrometry Data. In: *Electrophoresis*, Band 20(18):S. 3551–3567, 1999.
- Petritis, B. O., Qian, W. J., Camp, D. G. und Smith, R. D.: A Simple Procedure for Effective Quenching of Trypsin Activity and Prevention of O-18-Labeling Back-Exchange. In: *Journal of Proteome Research*, Band 8(5):S. 2157–2163, 2009.

- Posewitz, M. C. und Tempst, P.: Immobilized Gallium(III) Affinity Chromatography of Phosphopeptides. In: *Analytical Chemistry*, Band 71(14):S. 2883–2892, 1999.
- Preitner, N., Damiola, F., Molina, L. L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. und Schibler, U.: The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB Alpha Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. In: *Cell*, Band 110(2):S. 251–260, 2002.
- Qian, W. J., Gosche, M. B., Camp, D. G., Yu, L. R., Tang, K. Q. und Smith, R. D.: Phosphoprotein isotope-coded solid-phase tag approach for enrichment and quantitative analysis of phosphopeptides from complex mixtures. In: *Analytical Chemistry*, Band 75(20):S. 5441–5450, 2003.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. I. und Mann, M.: Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome. In: *Genome Research*, Band 12(8):S. 1231–1245, 2002.
- Reick, M., Garcia, J. A., Dudley, C. und McKnight, S. L.: NPAS2: An Analog of CLOCK Operative in the Mammalian Forebrain. In: *Science*, Band 293(5529):S. 506–509, 2001.
- Renart, J., Reiser, J. und Stark, G. R.: Transfer of Proteins from Gels to Diazobenzylxymethyl-Paper and Detection with Antisera - Method for Studying Antibody Specificity and Antigen Structure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 76(7):S. 3116–3120, 1979.
- Reppert, S. M. und Weaver, D. R.: Coordination of Circadian Timing in Mammals. In: *Nature*, Band 418:S. 935–941, 2002.
- Reynolds, E. C., Riley, P. F. und Adamson, N. J.: A Selective Precipitation Purification Procedure for Multiple Phosphoserine-Containing Peptides and Methods for Their Identification. In: *Analytical Biochemistry*, Band 217(2):S. 277–284, 1994.
- Ritter, L. S., Gooding, K. M., Hodge, B. D. und Julian, R. K.: Comparison of the Paul Ion Trap to the Linear Ion Trap for use in Global Proteomics. In: *Proteomics*, Band 6(6):S. 1735–1740, 2006.
- Rivera, J. G., Choi, Y. S., Vujcic, S., Wood, T. D. und Colon, L. A.: Enrichment/Isolation of Phosphorylated Peptides on Hafnium Oxide Prior to Mass Spectrometric Analysis. In: *Analyst*, Band 134(1):S. 31–33, 2009.
- Roepstorff, P. und Fohlman, J.: Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass-Spectra of Peptides. In: *Biomedical Mass Spectrometry*, Band 11(11):S. 601–601, 1984.
- Rose, K., Simona, M. G., Offord, R. E., Prior, C. P., Otto, B. und Thatcher, D. R.: A New Mass-Spectrometric C-Terminal Sequencing Technique Finds a Similarity Between Gamma-Interferon and Alpha-2-Interferon and Identifies a Proteolytically Clipped Gamma-Interferon That Retains Full Antiviral Activity. In: *Biochemical Journal*, Band 215(2):S. 273–277, 1983.

- Ross, P. L., Huang, Y. L. N., Marchese, J. N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A. und Pappin, D. J.: Multiplexed Protein Quantitation in *Saccharomyces Cerevisiae* using Amine-Reactive Isobaric Tagging Reagents. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 3(12):S. 1154–1169, 2004.
- Salomon, A. R., Ficarro, S. B., Brill, L. M., Brinker, A., Phung, Q. T., Ericson, C., Sauer, K., Brock, A., Horn, D. M., Schultz, P. G. und Peters, E. C.: Profiling of Tyrosine Phosphorylation Pathways in Human Cells using Mass Spectrometry. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 100(2):S. 443–448, 2003.
- Sanz-Medel, A.: ICP-MS for Multiplex Absolute Determinations of Proteins. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Band 398(5):S. 1853–1859, 2010.
- Sathyanarayanan, S., Zheng, X. Z., Xiao, R. und Sehgal, A.: Posttranslational Regulation of *Drosophila* PERIOD Protein by Protein Phosphatase 2A. In: *Cell*, Band 116(4):S. 603–615, 2004.
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., Fitzgerald, G. A., Kay, S. A. und Hogenesch, J. B.: A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock. In: *Neuron*, Band 43(4):S. 527–537, 2004.
- Schlosser, A., Pipkorn, R., Bossemeyer, D. und Lehmann, W. D.: Analysis of Protein Phosphorylation by a Combination of Elastase Digestion and Neutral Loss Tandem Mass Spectrometry. In: *Analytical Chemistry*, Band 73(2):S. 170–176, 2001.
- Schlosser, A., Vanselow, J. T. und Kramer, A.: Mapping of Phosphorylation Sites by a Multi-Protease Approach with Specific Phosphopeptide Enrichment and NanoLC-MS/MS Analysis. In: *Analytical Chemistry*, Band 77(16):S. 5243–5250, 2005.
- Schlosser, A., Vanselow, J. T. und Kramer, A.: Comprehensive Phosphorylation Site Analysis of Individual Phosphoproteins Applying Scoring Schemes for MS/MS Data. In: *Analytical Chemistry*, Band 79(19):S. 7439–7449, 2007.
- Schmidt, A., Kellermann, J. und Lottspeich, F.: A Novel Strategy for Quantitative Proteomics Using Isotope-Coded Protein Labels. In: *Proteomics*, Band 5(1):S. 4–15, 2005.
- Schmutz, I., Wendt, S., Schnell, A., Kramer, A., Mansuy, I. M. und Albrecht, U.: Protein Phosphatase 1 (PP1) Is a Post-Translational Regulator of the Mammalian Circadian Clock. In: *Plos One*, Band 6(6), 2011.
- Schnolzer, M., Jedrzejewski, P. und Lehmann, W. D.: Protease-Catalyzed Incorporation of O-18 into Peptide Fragments and its Application for Protein Sequencing by Electrospray and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. In: *Electrophoresis*, Band 17(5):S. 945–953, 1996.

- Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., Schwartz, J. C., Hunt, D. F. und Coon, J. J.: A Neutral Loss Activation Method for Improved Phosphopeptide Sequence Analysis by Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. In: *Analytical Chemistry*, Band 76(13):S. 3590–3598, 2004.
- Schwarz, G., Beck, S., Weller, M. G. und Linscheid, M. W.: MeCAT-New Iodoacetamide Reagents for Metal Labeling of Proteins and Peptides. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Band 401(4):S. 1203–1209, 2011.
- Seidler, J., Adal, M., Kubler, D., Bossemeyer, D. und Lehmann, W. D.: Analysis of Autophosphorylation Sites in the Recombinant Catalytic Subunit Alpha of cAMP-Dependent Kinase by Nano-UPLC-ESI-MS/MS. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Band 395(6):S. 1713–1720, 2009.
- Seidler, J., Zinn, N., Haaf, E., Boehm, M. E., Winter, D., Schlosser, A. und Lehmann, W. D.: Metal Ion-Mobilizing Additives for Comprehensive Detection of Femtomole Amounts of Phosphopeptides by Reversed Phase LC-MS. In: *Amino Acids*, Band 41(2):S. 311–320, 2011.
- Sevinsky, J. R., Bundy, J. L., Brown, K. J., Cargile, B. J. und Stephenson, J. L.: Minimizing Back Exchange in O-18/O-16 Quantitative Proteomics Experiments by Incorporation of Immobilized Trypsin into the Initial Digestion Step. In: *Analytical Chemistry*, Band 79(5):S. 2158–2162, 2007.
- Sharon, N., Neumann, H. und Grisaro, V.: Pepsin-Catalyzed Exchange of Oxygen Atoms between Water and Carboxylic Acids. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Band 97(1):S. 219–221, 1962.
- Shaw, N. und Stead, A.: The Reaction of Phosphoglycolipids and Other Lipids with Hydrofluoric Acid. In: *Biochemical Journal*, Band 143:S. 461–464, 1974.
- Shearman, L. P., Sriram, S., Weaver, D. R., Maywood, E. S., Chaves, I., Zheng, B. H., Kume, K., Lee, C. C., van der Horst, G. T. J., Hastings, M. H. und Reppert, S. M.: Interacting Molecular Loops in the Mammalian Circadian Clock. In: *Science*, Band 288(5468):S. 1013–1019, 2000.
- Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski, L. F. und Reppert, S. M.: Two Period Homologs: Circadian Expression and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei. In: *Neuron*, Band 19(6):S. 1261–1269, 1997.
- Shirogane, T., Jin, J. P., Ang, X. L. und Harper, J. W.: SCF Beta-TRCP Controls Clock-Dependent Transcription via Casein Kinase 1-Dependent Degradation of the Mammalian Period-1 (per1) Protein. In: *Journal of Biological Chemistry*, Band 280(29):S. 26863–26872, 2005.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C.: Measurement of

- Protein Using Bicinchoninic Acid. In: *Analytical Biochemistry*, Band 150(1):S. 76–85, 1985.
- Staab, H. A.: Synthese, Eigenschaften und Preparative Verwendung von N,N'-Carbonyl-di-imidazol. In: *Angewandte Chemie-International Edition*, Band 68(23):S. 754–754, 1956.
- Staab, H. A.: Synthesen mit Heterocyclischen Amiden (Azoliden). In: *Angewandte Chemie-International Edition*, Band 74(12):S. 407–407, 1962.
- Steen, H., Jebanathirajah, J. A., Springer, M. und Kirschner, M. W.: Stable Isotope-Free Relative and Absolute Quantitation of Protein Phosphorylation Stoichiometry by MS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 102(11):S. 3948–3953, 2005.
- Steen, H., Kuster, B., Fernandez, M., Pandey, A. und Mann, M.: Detection of Tyrosine Phosphorylated Peptides by Precursor Ion Scanning Quadrupole TOF Mass Spectrometry in Positive Ion Mode. In: *Analytical Chemistry*, Band 73(7):S. 1440–1448, 2001.
- Stewart, I. I., Thomson, T. und Figeys, D.: O-18 Labeling: a Tool for Proteomics. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Band 15(24):S. 2456–2465, 2001.
- Stingl, C., Ihling, C., Ammerer, G., Sinz, A. und Mechtler, K.: Application of Different Fragmentation Techniques for the Analysis of Phosphopeptides using a Hybrid Linear Ion Trap-FTICR Mass Spectrometer. In: *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, Band 1764(12):S. 1842–1852, 2006.
- Sturm, M., Leitner, A., Smatt, J. H., Linden, M. und Lindner, W.: Tin Dioxide Microparticles as a Promising Material for Phosphopeptide Enrichment Prior to Liquid Chromatography-(Tandem) Mass Spectrometry Analysis. In: *Advanced Functional Materials*, Band 18(16):S. 2381–2389, 2008.
- Sugiyama, N., Masuda, T., Shinoda, K., Nakamura, A., Tomita, M. und Ishihama, Y.: Phosphopeptide Enrichment by Aliphatic Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography for Nano-lc-ms/ms in Proteomics Applications. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 6(6):S. 1103–1109, 2007.
- Sun, Z. S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G. und Lee, C. C.: RIGUI, a Putative Mammalian Ortholog of the Drosophila Period Gene. In: *Cell*, Band 90(6):S. 1003–1011, 1997.
- Swaney, D. L., McAlister, G. C., Wirtala, M., Schwartz, J. C., Syka, J. E. P. und Coon, J. J.: Supplemental Activation Method for High-Efficiency Electron-Transfer Dissociation of Doubly Protonated Peptide Precursors. In: *Analytical Chemistry*, Band 79(2):S. 477–485, 2007.

- Sweet, S. M. M., Bailey, C. M., Cunningham, D. L., Heath, J. K. und Cooper, H. J.: Large Scale Localization of Protein Phosphorylation by use of Electron Capture Dissociation Mass Spectrometry. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 8(5):S. 904–912, 2009.
- Syka, J. E. P., Coon, J. J., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J. und Hunt, D. F.: Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 101(26):S. 9528–9533, 2004.
- Takano, A., Isojima, Y. und Nagai, K.: Identification of mPer1 Phosphorylation Sites Responsible for the Nuclear Entry. In: *Journal of Biological Chemistry*, Band 279(31):S. 32578–32585, 2004.
- Takumi, T., Taguchi, K., Miyake, S., Sakakida, Y., Takashima, N., Matsubara, C., Maebayashi, Y., Okumura, K., Takekida, S., Yamamoto, S., Yagita, K., Yan, L., Young, M. W. und Okamura, H.: A Light-Independent Oscillatory Gene mPer3 in Mouse SCN and OVL. In: *Embo Journal*, Band 17(16):S. 4753–4759, 1998.
- Tan, F., Zhang, Y., Wang, J., Wei, J., Cai, Y. und Qian, X.: An Efficient Method for Dephosphorylation of Phosphopeptides by Cerium Oxide. In: *Journal of Mass Spectrometry*, Band 43(5):S. 628–632, 2008.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. und Matsuo, T.: Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Band 2(8):S. 151–153, 1988.
- Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M. und Sakaki, Y.: Circadian oscillation of a mammalian homologue of the drosophila period gene. In: *Nature*, Band 389(6650):S. 512–516, 1997.
- Thiede, B., Lamer, S., Mattow, J., Siejak, F., Dimmler, C., Rudel, T. und Jungblut, P. R.: Analysis of Missed Cleavage Sites, Tryptophan Oxidation and N-Terminal Pyroglutamylation after in-Gel Tryptic Digestion. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Band 14(6):S. 496–502, 2000.
- Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Robinson, P. J. und Larsen, M. R.: SIMAC (Sequential Elution from IMAC), a Phosphoproteomics Strategy for the Rapid Separation of Monophosphorylated from Multiply Phosphorylated Peptides. In: *Molecular & Cellular Proteomics*, Band 7(4):S. 661–671, 2008.
- Thingholm, T. E., Jorgensen, T. J. D., Jensen, O. N. und Larsen, M. R.: Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides using Titanium Dioxide. In: *Nature Protocols*, Band 1(4):S. 1929–1935, 2006.
- Tholey, A., Reed, J. und Lehmann, W. D.: Electrospray Tandem Mass Spectrometric Studies of Phosphopeptides and Phosphopeptide Analogues. In: *Journal of Mass Spectrometry*, Band 34(2):S. 117–123, 1999.



- Thompson, A., Schaefer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R. A. W., Mohammed, A. K. A. und Hamon, C.: Tandem Mass Tags: A Novel Quantification Strategy for Comparative Analysis of Complex Protein Mixtures by MS/MS. In: *Analytical Chemistry*, Band 75(8):S. 1895–1904, 2003.
- Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptacek, L. J. und Fu, Y. H.: An hper2 Phosphorylation Site Mutation in Familial Advanced Sleep Phase Syndrome. In: *Science*, Band 291(5506):S. 1040–1043, 2001.
- Tsuchiya, Y., Akashi, M., Matsuda, M., Goto, K., Miyata, Y., Node, K. und Nishida, E.: Involvement of the Protein Kinase CK2 in the Regulation of Mammalian Circadian Rhythms. In: *Science Signaling*, Band 2(73), 2009.
- Ueda, H. R., Chen, W. B., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagan, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y. und Hashimoto, S.: A Transcription Factor Response Element for Gene Expression during Circadian Night. In: *Nature*, Band 418(6897):S. 534–539, 2002.
- Van Hoof, D., Pinkse, M. W. H., Oostwaard, D. W. V., Mummery, C. L., Heck, A. J. R. und Krijgsveld, J.: An Experimental Correction for Arginine-to-Proline Conversion Artifacts in SILAC-based Quantitative Proteomics. In: *Nature Methods*, Band 4(9):S. 677–678, 2007.
- Vanselow, J. T. und Kramer, A.: *Posttranslational Regulation of Circadian Clocks, The Circadian Clock*, Springer New York, Band 12 von *Protein Reviews*, Kapitel 3, S. 79–104. 2010.
- Vanselow, K., Vanselow, J. T., Westermarck, P. O., Reischl, S., Maier, B., Korte, T., Herrmann, A., Herzog, H., Schlosser, A. und Kramer, A.: Differential Effects of PER2 Phosphorylation: Molecular Basis for the Human Familial Advanced Sleep Phase Syndrome (FASPS). In: *Genes & Development*, Band 20(19):S. 2660–2672, 2006.
- Verley, A. und Bölsing, Fr.: Bestimmung des Eugenols im Nelkenöl. In: *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, Band 34(3):S. 3359–3362, 1901.
- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z. H. und Virshup, D. M.: Nuclear Entry of the Circadian Regulator mPER1 is Controlled by Mammalian Casein Kinase I Epsilon. In: *Molecular and Cellular Biology*, Band 20(13):S. 4888–4899, 2000.
- Vielhaber, E. L., Duricka, D., Ullman, K. S. und Virshup, D. M.: Nuclear Export of Mammalian PERIOD Proteins. In: *Journal of Biological Chemistry*, Band 276(49):S. 45921–45927, 2001.
- Villen, J., Beausoleil, S. A., Gerber, S. A. und Gygi, S. P.: Large-Scale Phosphorylation Analysis of Mouse Liver. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 104(5):S. 1488–1493, 2007.

- Wang, M., Feng, W. Y., Zhao, Y. L. und Chai, Z. F.: ICP-MS-Based Strategies for Protein Quantification. In: *Mass Spectrometry Reviews*, Band 29(2):S. 326–348, 2010.
- Weckwerth, W., Willmitzer, L. und Fiehn, O.: Comparative Quantification and Identification of Phosphoproteins Using Stable Isotope Labeling and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Band 14(18):S. 1677–1681, 2000.
- Whetstone, P. A., Butlin, N. G., Corneillie, T. M. und Meares, C. F.: Element-Coded Affinity Tags for Peptides and Proteins. In: *Bioconjugate Chemistry*, Band 15(1):S. 3–6, 2004.
- White, C. A., Oey, N. und Emili, A.: Global Quantitative Proteomic Profiling through O-18-Labeling in Combination with MS/MS Spectra Analysis. In: *Journal of Proteome Research*, Band 8(7):S. 3653–3665, 2009.
- Wind, M., Edler, M., Jakubowski, N., Linscheid, M., Wesch, H. und Lehmann, W. D.: Analysis of Protein Phosphorylation by Capillary Liquid Chromatography Coupled to Element Mass Spectrometry with P-31 Detection and to Electrospray Mass Spectrometry. In: *Analytical Chemistry*, Band 73(1):S. 29–35, 2001a.
- Wind, M., Wegener, A., Kellner, R. und Lehmann, W. D.: Analysis of CheA Histidine Phosphorylation and its Influence on Protein Stability by High-Resolution Element and Electrospray Mass Spectrometry. In: *Analytical Chemistry*, Band 77(7):S. 1957–1962, 2005.
- Wind, M., Wesch, H. und Lehmann, W. D.: Protein Phosphorylation Degree: Determination by Capillary Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. In: *Analytical Chemistry*, Band 73(13):S. 3006–3010, 2001b.
- Winter, D., Seidler, J., Kugelstadt, D., Derrer, B., Kappes, B. und Lehmann, W. D.: Minimally Permuted Peptide Analogs as Internal Standards for Relative and Absolute Quantification of Peptides and Proteins. In: *Proteomics*, Band 10(7):S. 1510–1514, 2010.
- Wisniewski, J. R., Nagaraj, N., Zougman, A., Gnäd, F. und Mann, M.: Brain Phosphoproteome Obtained by a FASP-Based Method Reveals Plasma Membrane Protein Topology. In: *Journal of Proteome Research*, Band 9(6):S. 3280–3289, 2010.
- Wolschin, F., Wienkoop, S. und Weckwerth, W.: Enrichment of Phosphorylated Proteins and Peptides from Complex Mixtures using Metal Oxide/Hydroxide Affinity Chromatography (MOAC). In: *Proteomics*, Band 5(17):S. 4389–4397, 2005.
- Woo, E. M., Fenyo, D., Kwok, B. H., Funabiki, H. und Chait, B. T.: Efficient Identification of Phosphorylation by Mass Spectrometric Phosphopeptide Fingerprinting. In: *Analytical Chemistry*, Band 80(7):S. 2419–2425, 2008.

- Wu, J., Shakey, Q., Liu, W., Schuller, A. und Follettie, M. T.: Global Profiling of Phosphopeptides by Titania Affinity Enrichment. In: *Journal of Proteome Research*, Band 6(12):S. 4684–4689, 2007.
- Xu, Y., Padiath, Q. S., Shapiro, R. E., Jones, C. R., Wu, S. C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptacek, L. J. und Fu, Y. H.: Functional Consequences of a CKI Delta Mutation Causing Familial Advanced Sleep Phase Syndrome. In: *Nature*, Band 434(7033):S. 640–644, 2005.
- Yagita, K., Tamanini, F., Yasuda, M., Hoeijmakers, J. H. J., van der Horst, G. T. J. und Okamura, H.: Nucleocytoplasmic Shuttling and mCRY-Dependent Inhibition of Ubiquitylation of the mPER2 Clock Protein. In: *Embo Journal*, Band 21(6):S. 1301–1314, 2002.
- Yang, J., Bardes, E. S. G., Moore, J. D., Brennan, J., Powers, M. A. und Kornbluth, S.: Control of Cyclin B1 Localization Through Regulated Binding of the Nuclear Export Factor CRM1. In: *Genes & Development*, Band 12(14):S. 2131–2143, 1998.
- Yang, Y. H., He, Q., Cheng, P., Wrage, P., Yarden, O. und Liu, Y.: Distinct Roles for PP1 and PP2A in the Neurospora Circadian Clock. In: *Genes & Development*, Band 18(3):S. 255–260, 2004.
- Yao, X. D., Afonso, C. und Fenselau, C.: Dissection of Proteolytic O-18 Labeling: Endoprotease-Catalyzed O-16-to-O-18 Exchange of Truncated Peptide Substrates. In: *Journal of Proteome Research*, Band 2(2):S. 147–152, 2003.
- Yates, J. R., Speicher, S., Griffin, P. R. und Hunkapiller, T.: Peptide Mass Maps - a Highly Informative Approach to Protein Identification. In: *Analytical Biochemistry*, Band 214(2):S. 397–408, 1993.
- Yost, R. A. und Enke, C. G.: Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass-Spectrometer. In: *Journal of the American Chemical Society*, Band 100(7):S. 2274–2275, 1978.
- Yost, R. A. und Enke, C. G.: Triple Quadrupole Mass-Spectrometry for Direct Mixture Analysis and Structure Elucidation. In: *Analytical Chemistry*, Band 51(12):S. 1251–1264, 1979.
- Yu, Y. H., Yoon, S. O., Poulogiannis, G., Yang, Q., Ma, X. J. M., Villen, J., Kubica, N., Hoffman, G. R., Cantley, L. C., Gygi, S. P. und Blenis, J.: Phosphoproteomic Analysis Identifies Grb10 as an mTORC1 Substrate That Negatively Regulates Insulin Signaling. In: *Science*, Band 332(6035):S. 1322–1326, 2011.
- Zhang, F., White, R. L. und Neufeld, K. L.: Phosphorylation Near Nuclear Localization Signal Regulates Nuclear Import of Adenomatous Polyposis Coli Protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 97(23):S. 12577–12582, 2000.

- Zheng, B. H., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W. Q., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z. S., Eichele, G., Bradley, A. und Lee, C. C.: Nonredundant Roles of the mPer1 and mPer2 Genes in the Mammalian Circadian Clock. In: *Cell*, Band 105(5):S. 683–694, 2001.
- Zhou, H. L., Ranish, J. A., Watts, J. D. und Aebersold, R.: Quantitative Proteome Analysis by Solid-phase Isotope Tagging and Mass Spectrometry. In: *Nature Biotechnology*, Band 20(5):S. 512–515, 2002.
- Zhou, H. L., Watts, J. D. und Aebersold, R.: A Systematic Approach to the Analysis of Protein Phosphorylation. In: *Nature Biotechnology*, Band 19(4):S. 375–378, 2001.
- Zhu, W. H., Smith, J. W. und Huang, C. M.: Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Zhuo, S., Clemens, J. C., Hakes, D. J., Barford, D. und Dixon, J. E.: Expression, Purification, Crystallization, and Biochemical-Characterization of a Recombinant Protein Phosphatase. In: *Journal of Biological Chemistry*, Band 268(24):S. 17754–17761, 1993.
- Zinn, N., Hahn, B., Pipkorn, R., Schwarzer, D. und Lehmann, W. D.: Phosphorus-Based Absolutely Quantified Standard Peptides for Quantitative Proteomics. In: *Journal of Proteome Research*, Band 8(10):S. 4870–4875, 2009.
- Zinn, N., Winter, D. und Lehmann, W. D.: Recombinant Isotope Labeled and Selenium Quantified Proteins for Absolute Protein Quantification. In: *Analytical Chemistry*, Band 82(6):S. 2334–2340, 2010.
- Zubarev, R. A., Horn, D. M., Fridriksson, E. K., Kelleher, N. L., Kruger, N. A., Lewis, M. A., Carpenter, B. K. und McLafferty, F. W.: Electron Capture Dissociation for Structural Characterization of Multiply Charged Protein Cations. In: *Analytical Chemistry*, Band 72(3):S. 563–573, 2000.
- Zumwalt, A., Choudhary, G., Cho, D., Hemenway, E. und Mylchreest, I.: Detection of Phosphorylated Peptides from Data Dependent MS3 Neutral-Loss Scans using a Linear Ion Trap Mass Spectrometer. In: *51st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. 2003.
- Zybailov, B., Coleman, M. K., Florens, L. und Washburn, M. P.: Correlation of Relative Abundance Ratios Derived from Peptide Ion Chromatograms and Spectrum Counting for Quantitative Proteomic Analysis using Stable Isotope Labeling. In: *Analytical Chemistry*, Band 77(19):S. 6218–6224, 2005.
- Zylka, M. J., Shearman, L. P., Weaver, D. R. und Reppert, S. M.: Three Period Homologs in Mammals: Differential Light Responses in the Suprachiasmatic Circadian Clock and Oscillating Transcripts Outside of Brain. In: *Neuron*, Band 20(6):S. 1103–1110, 1998.

## Anhang

# 1 Sequenzvergleich der mPER Proteine

mPER1	MSGPLEGADGGDPRPGEPFCPGGVPSPGAPQHRPCPGPSLADDDANSNGSSGNGESNGP	60
mPER2	MNGYVDFS-----PSTSPSTKE-----PGAPQP---TQAVLQEDVDMSS-GSSGNEN---	43
	*.* : : * * . * * * * . . * : * . * * * * * .	
mPER1	ESRGASQRSSSHSSSSSGNGKDSALLETTESKSTNSQSPSPSSSIAYSLLSASSEQDNPS	120
mPER2	--CSTGRDSQGSDDNGKELRMLVES-----SNTHPSPDDAFRLMMTEAEH-NPS	91
	. : . : * . * . . . . * : : * : * : * . * : * : : : * : * : * : * : *	
mPER1	TSGCSSEQSARARTQKELMTALRELKLRLPPERRGKGRSGTLATLQYALACVKQVQANQE	180
mPER2	TSGCSSEQSAKADAHKELIRTLKELKVHLPADKKAKGKASTLATLKYALRSVKQVKANEE	151
	* * * * * * * * * : : * * : : * * * : * . : : . * : : . * * * * : * * * : * * * : * * *	
mPER1	YYQQWSLEEGEPCAMDMSTYTLEELEHTTSEYTLRNQDTFSVAVSFLTGRIVYISEQAGV	240
mPER2	YYQLMSSSQPCSDVPSYSMEQVEGITSEYIVKNADMFAVAVSLVSGKILYISNQVAS	211
	* * * . * . : * : * : * : * : * : * * * * : * * * * * : * : * : * : * : * . .	
mPER1	LLRCKRDVFRGARFSELLAPQDVGVFYGSTTPSRLPTWGTGTSAGSGLKDFTEKSVFCR	300
mPER2	IFHCKKDAFSDAKFVEFLAPHDVSVFHSYTTPYKLPWSVCGLDSFTQECMEESFFCR	271
	: : * : * . * . * : * * * : * * * : * * * . * * * : * * * . * . . * : : * * * . * * *	
mPER1	IRGGPDRDPGPRYQPFRLTPYVTKIRVSDGAPAPCCLLIAERIHSGYEAPRIPDKRIF	360
mPER2	VSVGKHHENEIRYQPFRTMPTLVKVKVEQQAESQLCCLLLAERVHSGYEAPRIPPEKRIF	331
	: * . : * * * * * : * * : . : * * : * * * * : * * * * * * * * : * * *	
mPER1	TTRHTPSCLFQDVERAAPLLGYLPQDLLGAPVLLFLHPEDRPLMLAIHKKILQLAGQPF	420
mPER2	TTHTPNCLFQAVDERAVPLLGYLPQDLIETPVLVQLHPSDRPLMLAIHKKILQAGGQPF	391
	* * * * * . * * * * * * * * * * * : * * : * * . * * * * * * * * * * . * * *	
mPER1	DHSPIRFCARNGEYVTMDTSWAGFVHPWSRKVAFVLGRHKVRTAPLNEDVFTPPAPSPAP	480
mPER2	DYSPIRFRTRNGEYITLDTSWSSFINPWSRKISFIIGRHKVRVGPLNEDVFAASPCPEEK	451
	* : * * * * : * * * * : * * * * : . : : * * * * : * : * * * * . * * * * : . . .	
mPER1	SLDSDIQELSEIHRLLLPVHSSSPTGLCGVGPLMSPGPLHSPGSSSDSNGGDAEGPGP	540
mPER2	TPHPSVQELTEIHRLLMQVPVHSGSSGYSLGNSGSHEHLMSQTSSSDSNGQEESHRRR	511
	: . . : * * : * * * * * : * * * . . : * . * * * * * * : .	
mPER1	PAPVTFQQICKDVHLVKHQGQQLFIESRAKPPPRPRLLATGTFKAKVLPCQSPNPELEVA	600
mPER2	SGIFKTSGKIQTSHVSHESGGQKEASVAEMQSSP-----PAQVKAVTTIERDSSGA	563
	. . . . : * . * . * * : . * * * * : * : . : : . *	
mPER1	PVPDQASLALAPEEPERKETSGCSYQQINCLDSILRYLESCNIPSTTKRKCASSSSYTAS	660
mPER2	SLPKAS---FPEELAYKNQPPCSYQQISCLDSVIRYLESCSEATLKRKCEFPANIPSR	619
	. : * . : * * * * : . * * * * . * * * : * * * . : . . :	
mPER1	SASDDDKQRAGVPVPGAKKDPSSAMLSGEGATPRKEP---VVGGLSLPLALANKAESVVS	717
mPER2	KAT-----VSPGLHSGEAARPSKVTSHTEVSAHLSSLTLPKGAESVVS	662
	. * : * . : * * . * * * . * . * * . * : . * * * * *	

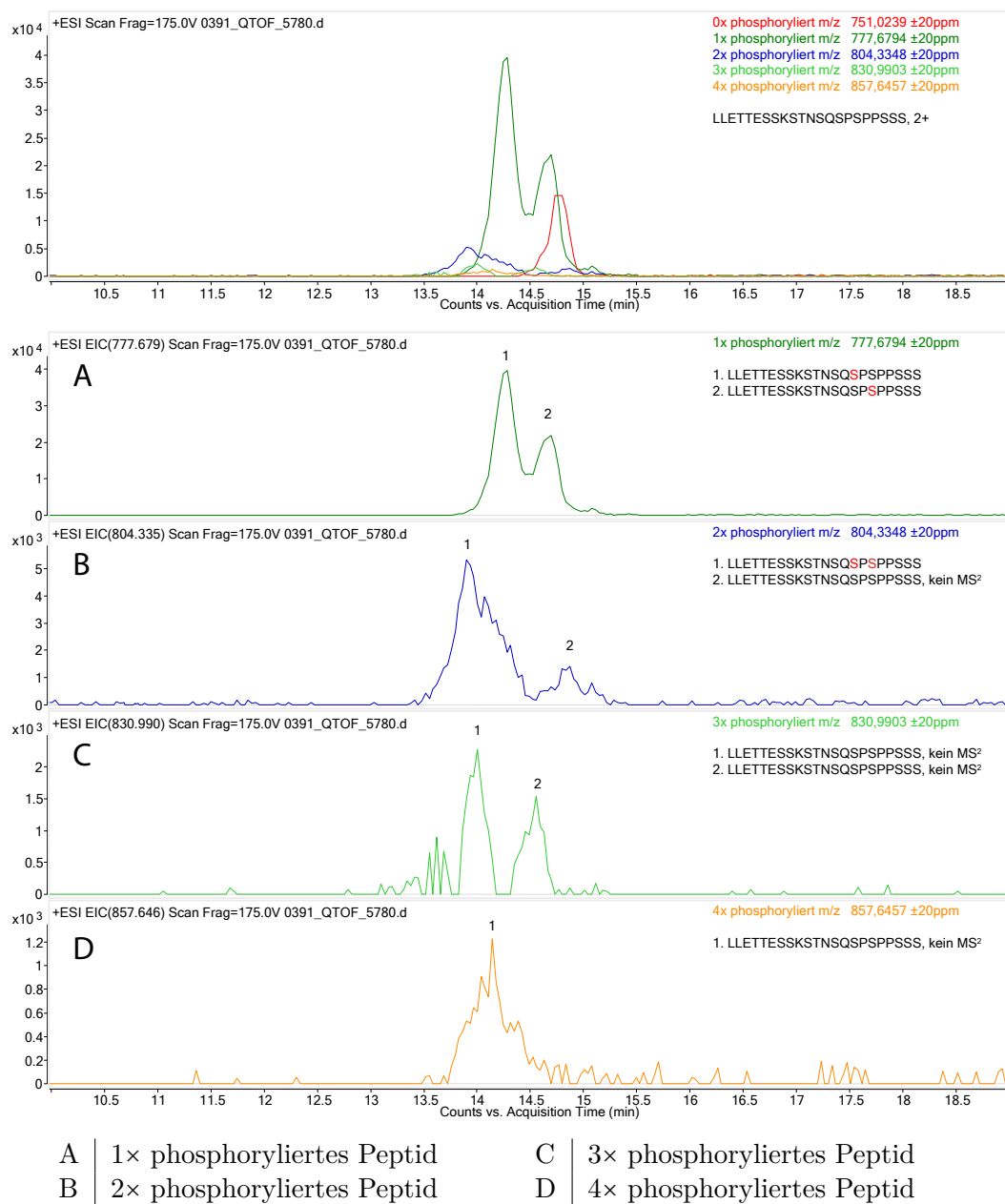
Abbildung 1 – Sequenzvergleich von mPER1 und mPER2 mit eingetragenen Phosphorylierungsstellen Teil 1; (\*) identische Aminosäuren, (:) starke und (.) schwache Ähnlichkeit der Aminosäuren

mPER1	VT <b>SQCSFS</b> STIVHVGDKKPESDIIMMEDLPG LAPGPAP <b>SPAP</b> SPTVAPDPTPDAYRPVG	777
mPER2	LT <b>SQCSYS</b> STIVHVGDKKPQE----LETVEDMA <b>SGPES</b> LDGAAGGL <b>SQ</b> EKGP--LQKLG	716
	:*****:***** . : * : .:*.** . .: : : * : :*	
mPER1	LTKAVLSLHTQKEEQAF LNRFRDLGR LRLG LDT-----SSVAPSAPGCHHGP-IPPG	827
mPER2	LTKEVLA AHTQREEQGFLQRFREVSRLSALQAHCQNYLQERSRAQASDRGLRNT <b>SGLESS</b>	776
	*** **: **:***.**:***:..** .*: : * . . * * : : . .	
mPER1	RRHHC RSKAKRSRHHHHQTPRPETP--CYVSHPSVP--SSGPWPPPPAT-----TPFP	877
mPER2	WKKTGKNRKLKSKRVKTRD <b>SSESTG</b> SGGPVSHRPPLMGLNATAWSPSDTSQSSCPSAPFP	836
	: : : : : : . . * *** .*: : : .*. .: : :***	
mPER1	AMVQPYPLPVFSPRG-----GPQPLPPAPTS-----VSPATFPSPLVT	915
mPER2	TAVPAYPLPVFQAPGIVSTPGTVVAPPAATHGTMPVVPMTQPEFAVQPLPFAAPLA-	895
	: * .*****. * * . ***. * . * .*:**.	
mPER1	PMVALVLPNYLFP--TP-----PSYPYGV SQAPVEGPPTPASHSPSPS----LPPP--	960
mPER2	PVMAFMLPSYFPFPATPNLPQAFLPSQPHFPAHPTLASEITPASQAEFPSRTSTLRQPCA	955
	*::*:**.* ** ** ** *: : : . . *****: ** * *	
mPER1	-PLSPPH-----RPDSPLFNSRC <b>SS</b> PLQLNLLQLEESPRTEGGAA--AGGPG <b>SS</b> AGPLP	1011
mPER2	CPVTPPAGTVALGR <b>SP</b> PLFQ <b>SRGSS</b> PLQLNLLQLEEAPGSTGAAGTLGTTGTAASGLD	1015
	*::** *...***:* *****:*. . *** * .*:*. *	
mPER1	PSEETA---EPEAR--LVEVTESSNQDAL <b>SGSS</b> DLELLLLQEDSRSGTSAASGSLGSGL	1066
mPER2	CTSGTSDRQPKAPPTCNEPSDTQNSDAISTSSDLLNLLGEDLCSATGSALSRSGA <b>SAT</b>	1075
	:. *: :*: * : : .*.*** *****:*** ** *.*** * * .*	
mPER1	GSGSGSGSHEGGSTASITRSSQSSTSKYFG <b>SID</b> <b>SSE</b> -AEAGAARARTEPGDQVIKCVL	1125
mPER2	<b>SD</b> SLGSSSLGFG-TSQSGAGSSDTSTSKYFG <b>SID</b> <b>SEN</b> NHKAKMIPDTEESEQFIKYVL	1134
	... **.* * * * : **:***** . . . ** .:*.** **	
mPER1	QDPIWLLMANADQRMVMTYQVPSRDAASVLKQDRERLRAMQKQPRFSEDQRRELGA VHS	1185
mPER2	QDPIWLLMANTDDSIMMTYQLPSRDLQAVLKEDQEKLKLLQRSQPRFTEGQRRELRE VHP	1194
	*****: : :*****:*** :***:***: :*:*****:*.***** **.	
mPER1	WVRKGQLPRALDVTACVDCGSSVQDPGH <b>SD</b> DLPLFSELDGLGLEPMEEGGEGGGCGVGGG	1245
mPER2	WVHTGGLPTAIDVTGCVYCES-----EEKGNICLPYEED <b>SP</b> SPGLC-----	1235
	**:. * ** *:***.* * * * . * * * * . * *	
mPER1	GGDGGEAAQTQIGAKGSSSQDSAMEEEQGGGSS <b>SP</b> ALPAEENSTSKGGRADPAFLYKVV	1305
mPER2	-----DTSEAKEEEGEQLTGPRIEAQ----TKGGRADPAFLYKVV	1271
	*: : :*: * :. * : * : *****	
mPER1	DLEGPRFEGKPIP NPLGLDSTRTGHHHHHH	1336
mPER2	DLEGPRFEGKPIP NPLGLDSTRTGHHHHHH	1302
	*****	

**Abbildung 2** – Sequenzvergleich von mPER1 und mPER2 mit eingetragenen Phosphorylierungsstellen Teil 2; (\*) identische Aminosäuren, (:) starke und (.) schwache Ähnlichkeit der Aminosäuren

## 2 Phosphoisomere von mPER1

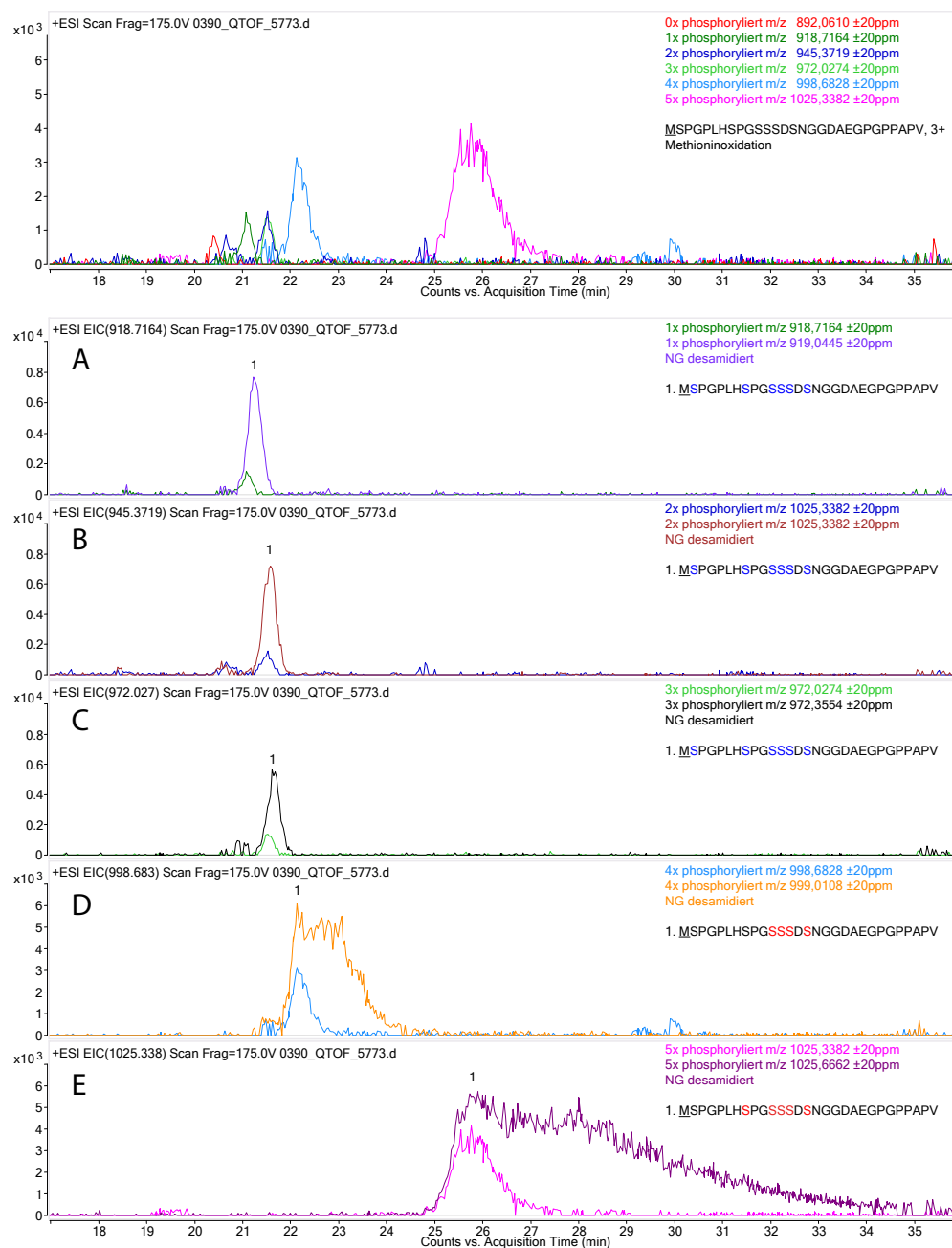
### Phosphorylierung des Clusters A (83–104) von mPER1



**Abbildung 3** – Analyse der Phosphoisomere von LLETTESSKSTNSQSPSPSSS von mPER1



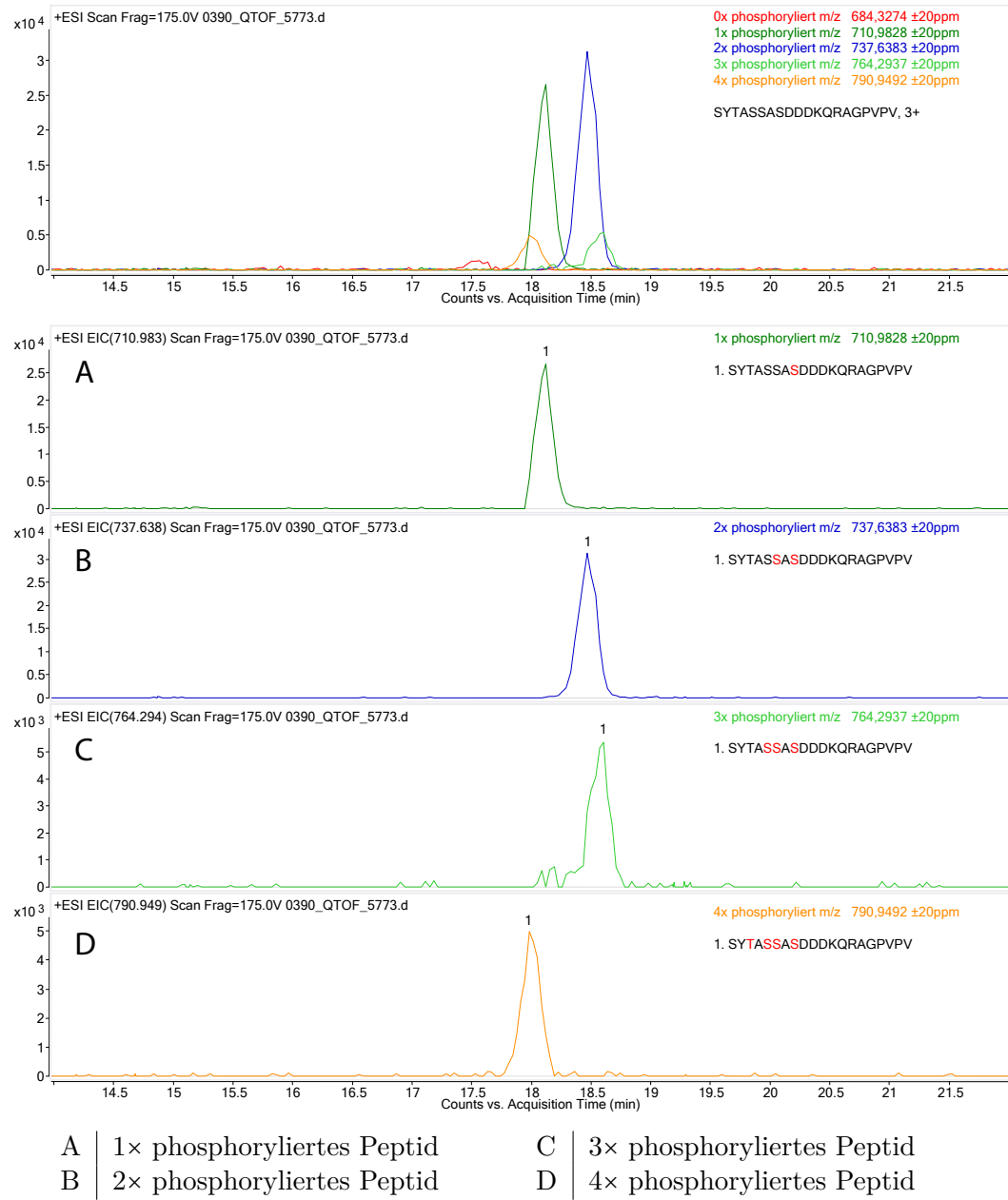
## Phosphorylierung des Clusters B (516–544) von mPER1



A   1× phosphor. Peptide	C   3× phosphor. Peptide	E   5× phosphor. Peptide
B   2× phosphor. Peptide	D   4× phosphor. Peptide	

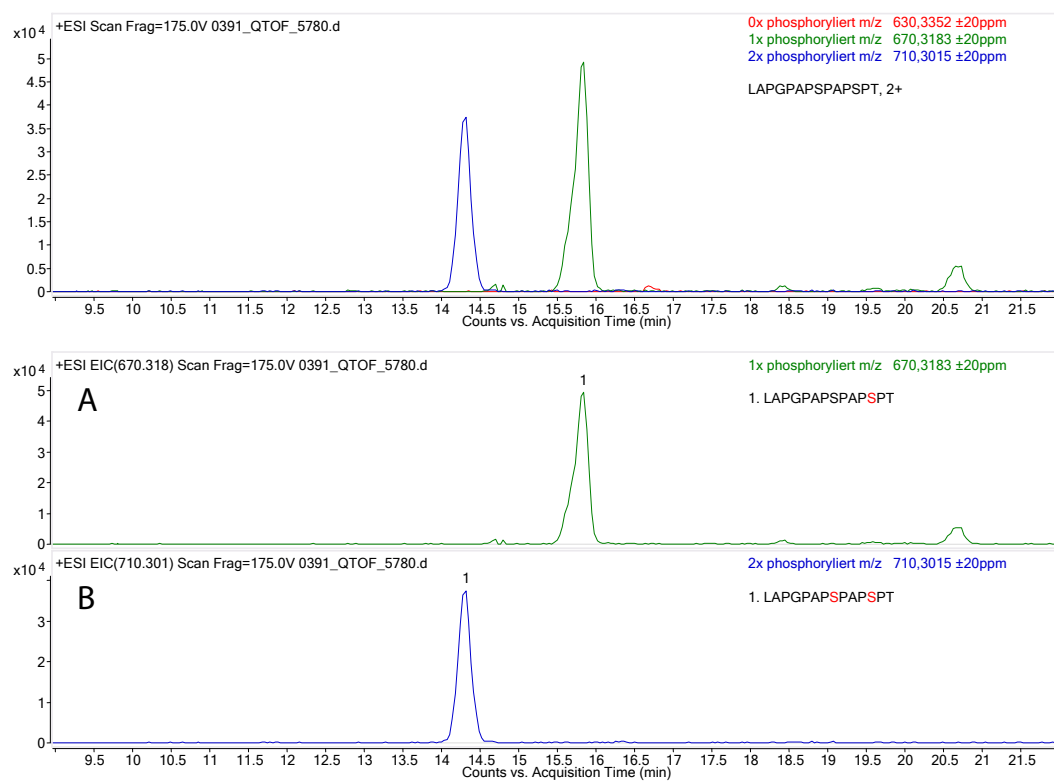
**Abbildung 4** – Analyse der Phosphoisomere von MSPGPLHSPGSSSDSNGGDAEGPGPPAPV von mPER1 (1×Methioninoxidation)

## Phosphorylierung des Clusters C (658–663) von mPER1



**Abbildung 5** – Analyse der Phosphoisomere von SYTASSASDDDKQRAGVPVPV von mPER1

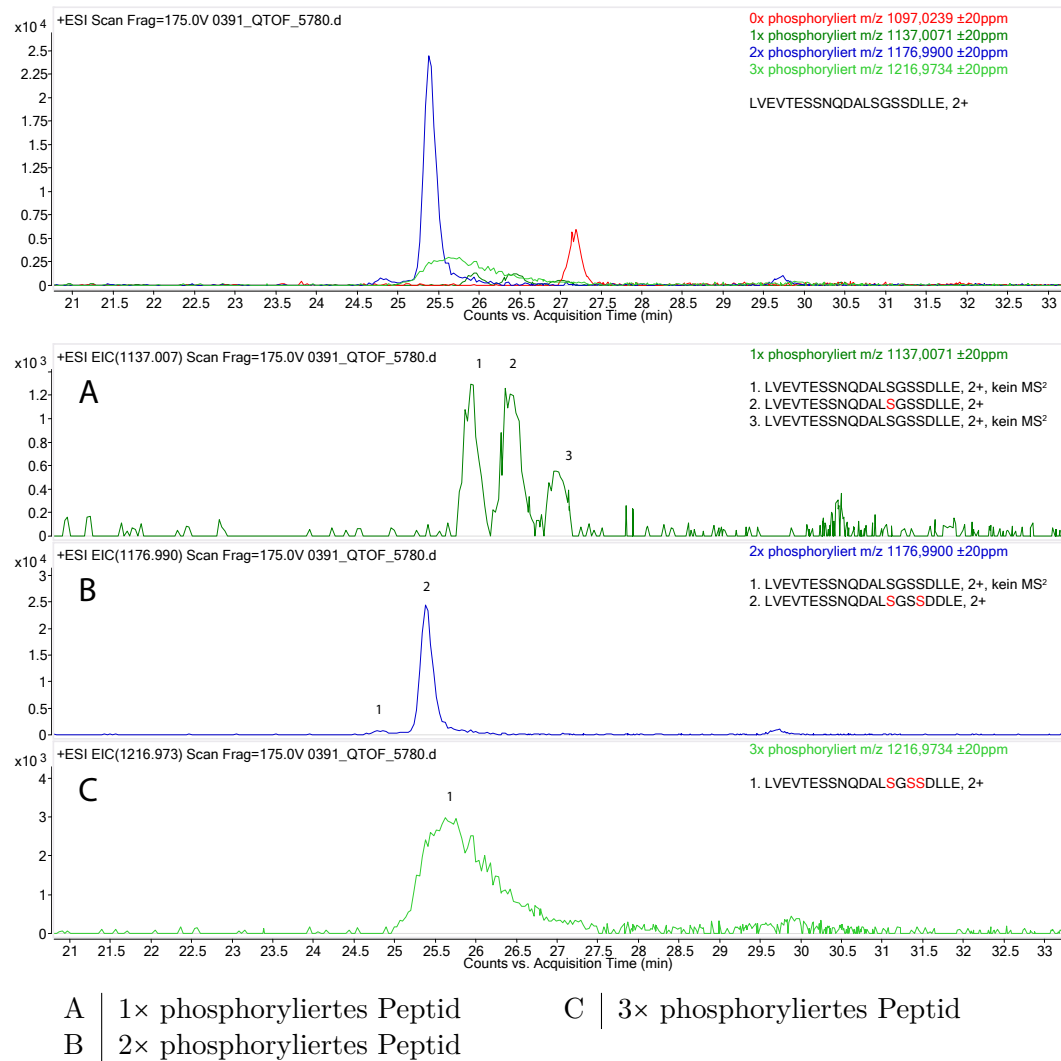
## Phosphorylierung des Clusters D (757–761) von mPER1



A | 1× phosphoryliertes Peptid  
B | 2× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 6** – Analyse der Phosphoisomere von LAPGPAPSPAPSPT von mPER1

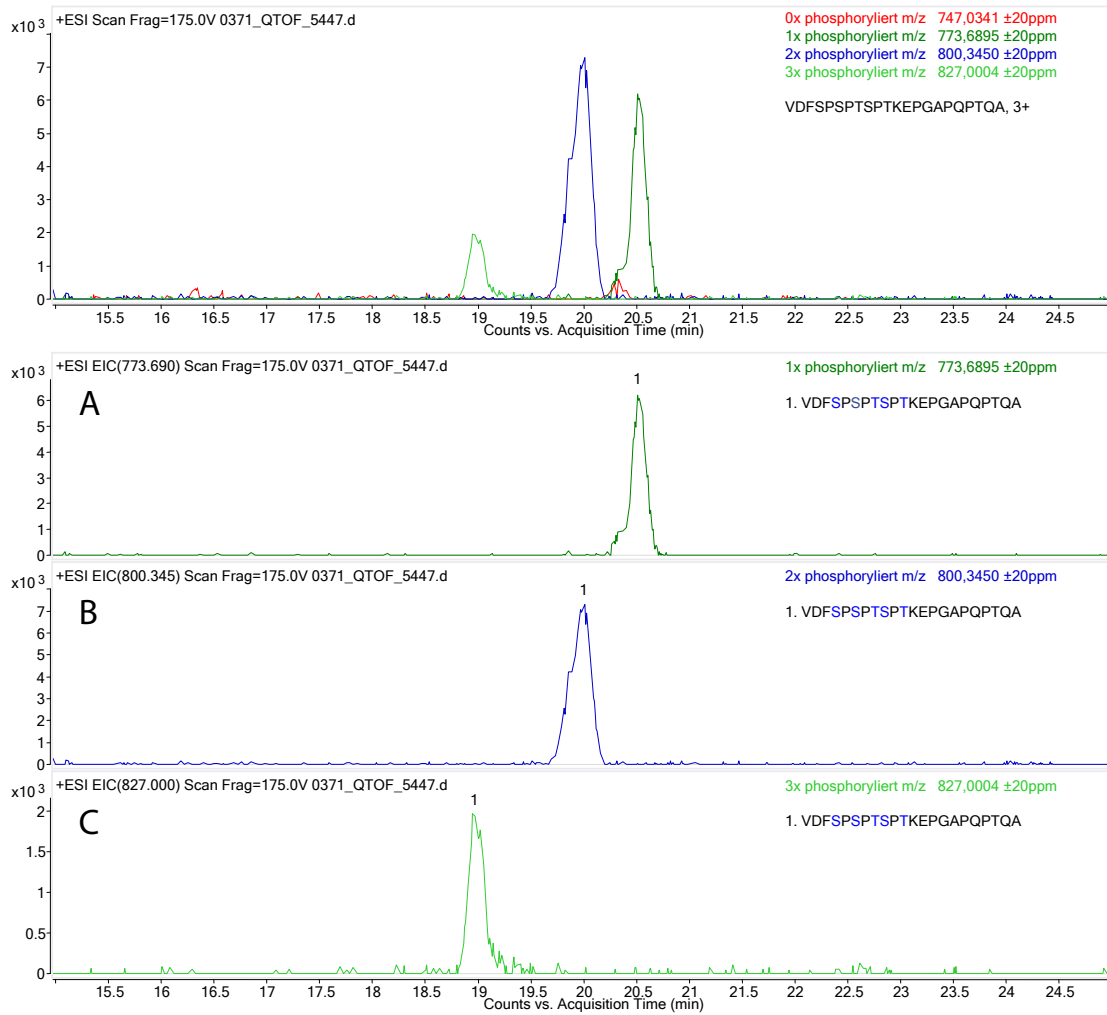
## Phosphorylierung des Clusters E (1036–1039) von mPER1



**Abbildung 7** – Analyse der Phosphoisomere von LVEVTESSNQDALSGSSDLLE von mPER1

### 3 Phosphoisomere von mPER2

#### Phosphorylierung des Clusters a (9–15) von mPER2

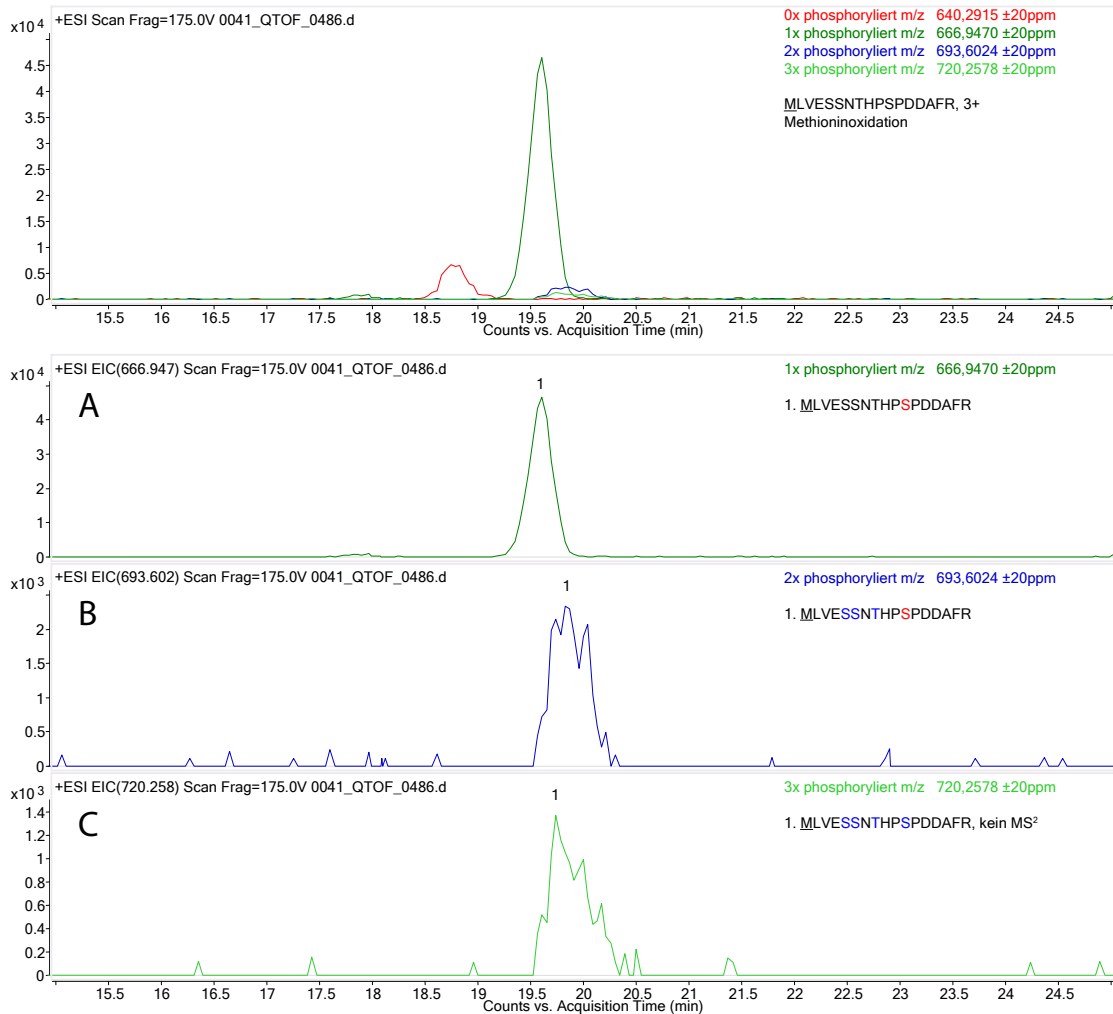


A | 1× phosphoryliertes Peptid  
 B | 2× phosphoryliertes Peptid

C | 3× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 8** – Analyse der Phosphoisomere von VDFSPSPSTPTKEPGAPQPTQA von mPER2

## Phosphorylierung des Clusters b (74–79) von mPER2

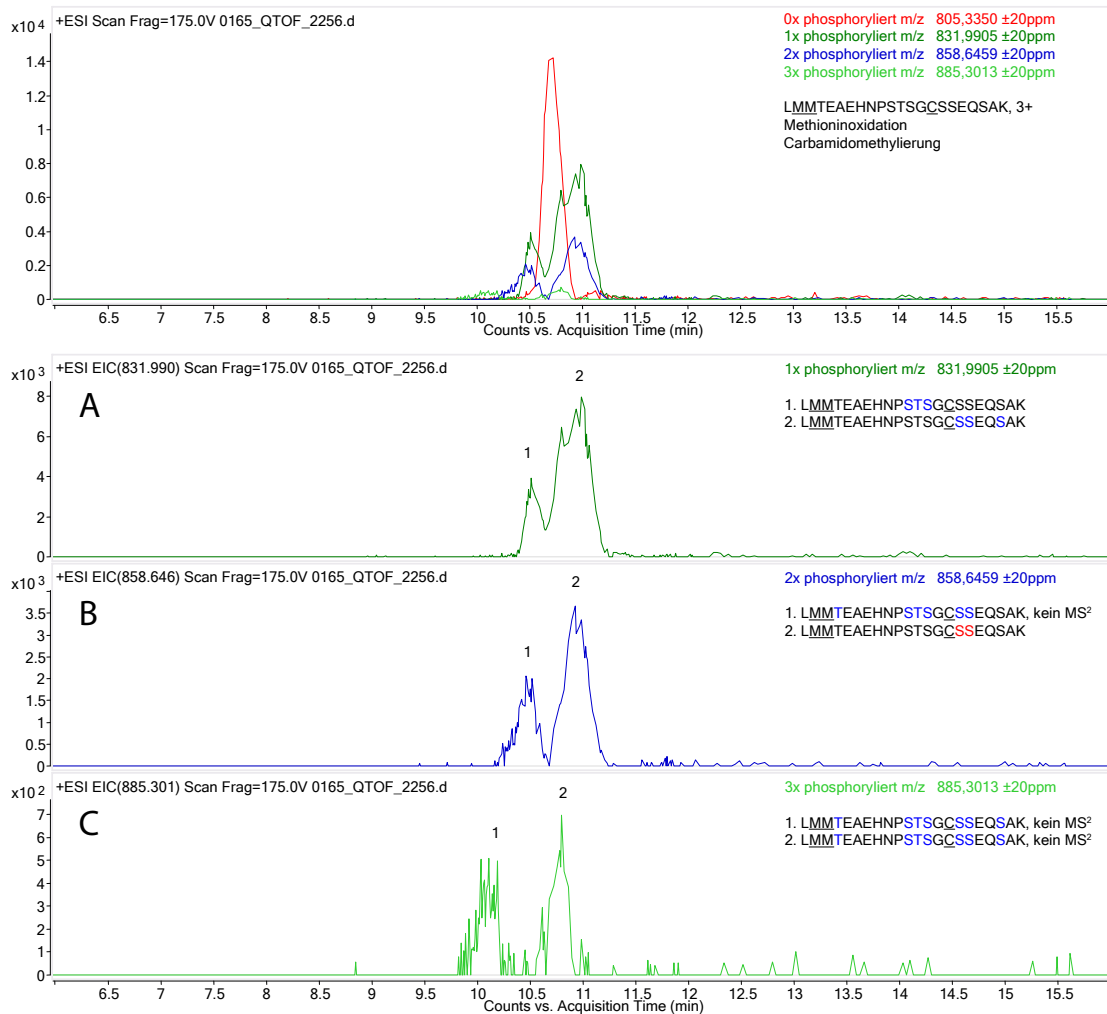


A | 1× phosphoryliertes Peptid  
 B | 2× phosphoryliertes Peptid

C | 3× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 9** – Analyse der Phosphoisomere von MLVSSNTHPSDDAFR von mPER2, (1×Methioninoxidation)

## Phosphorylierung des Clusters c (91–100) von mPER2

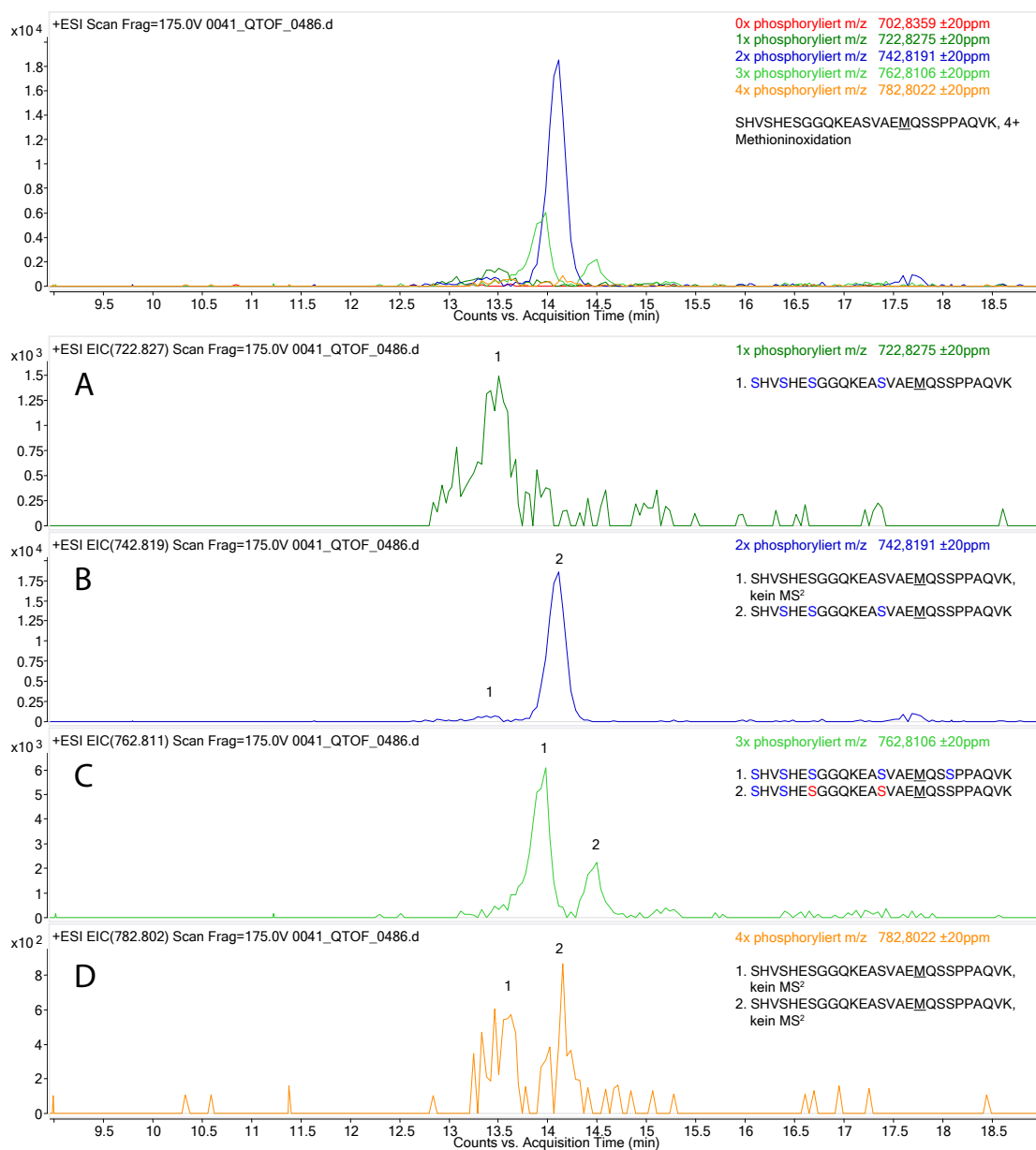


A | 1× phosphoryliertes Peptid  
B | 2× phosphoryliertes Peptid

C | 3× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 10** – Analyse der Phosphoisomere von LMMTEAEHNPSTSGCSSEQSAK von mPER2 (2×Methioninoxidation, 1×Carbamidomethylierung)

## Phosphorylierung des Clusters d (525–545) von mPER2



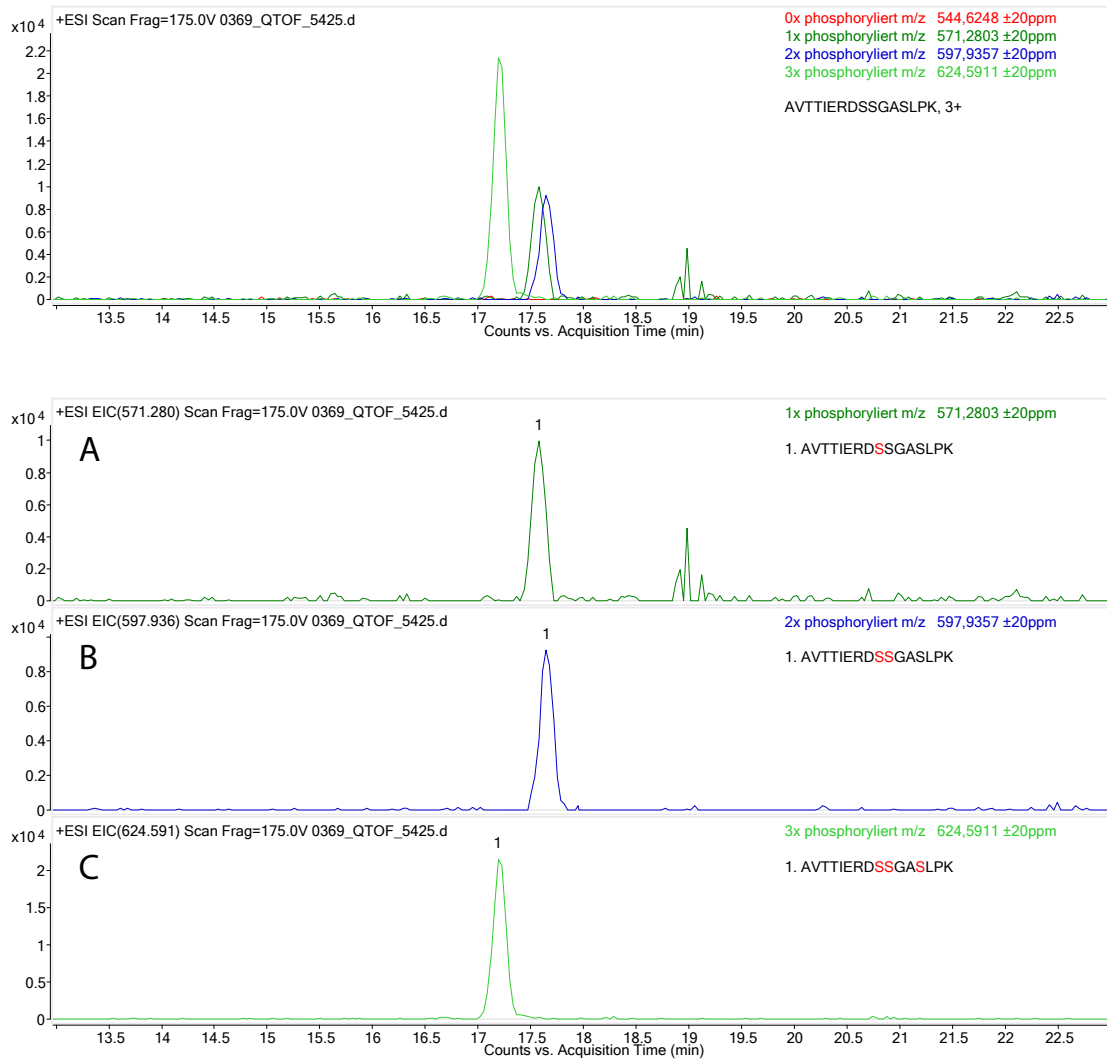
A | 1× phosphoryliertes Peptid  
 B | 2× phosphoryliertes Peptid

C | 3× phosphoryliertes Peptid  
 D | 4× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 11** – Analyse der Phosphoisomere von SHVSHESGGQKEASVAFMQSSPPAQVK von mPER2 (1×Methioninoxidation)



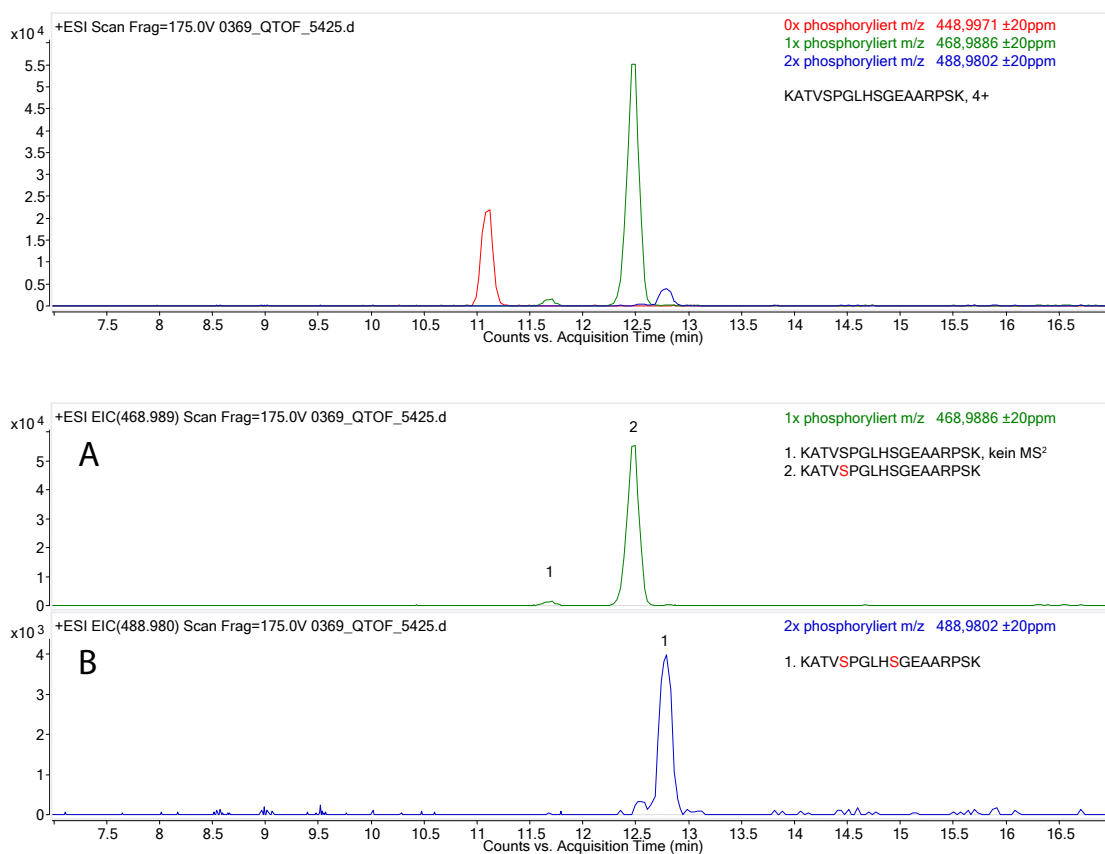
## Phosphorylierung des Clusters e (560–564) von mPER2



A		1× phosphoryliertes Peptid	C		3× phosphoryliertes Peptid
B		2× phosphoryliertes Peptid			

**Abbildung 12** – Analyse der Phosphoisomere von AVTTIERDSSGASLPK von mPER2

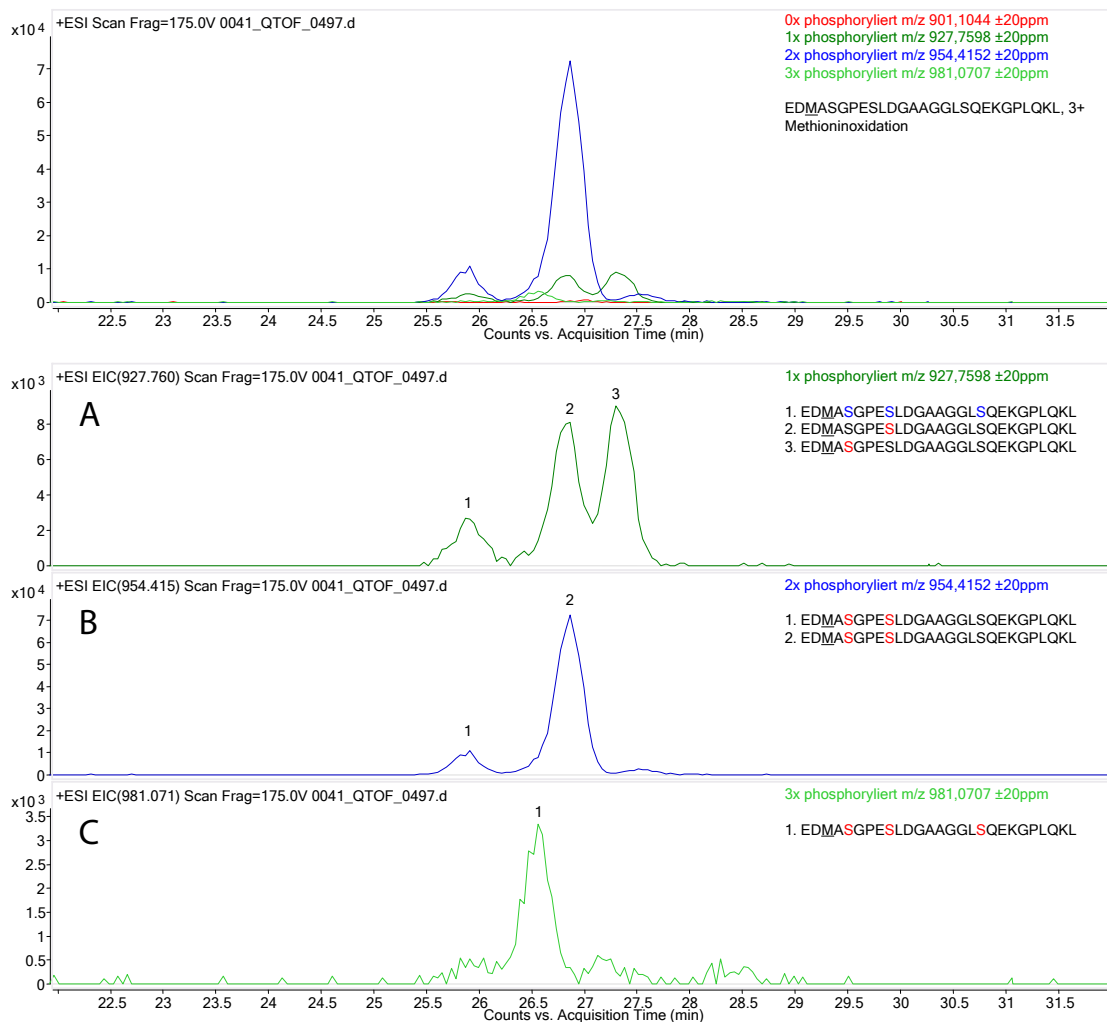
## Phosphorylierung des Clusters f (624–629) von mPER2



A | 1× phosphoryliertes Peptid  
 B | 2× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 13** – Analyse der Phosphoisomere von KATVSPGLHSGEAAARPSK von mPER2

## Phosphorylierung des Clusters g (693–706) von mPER2

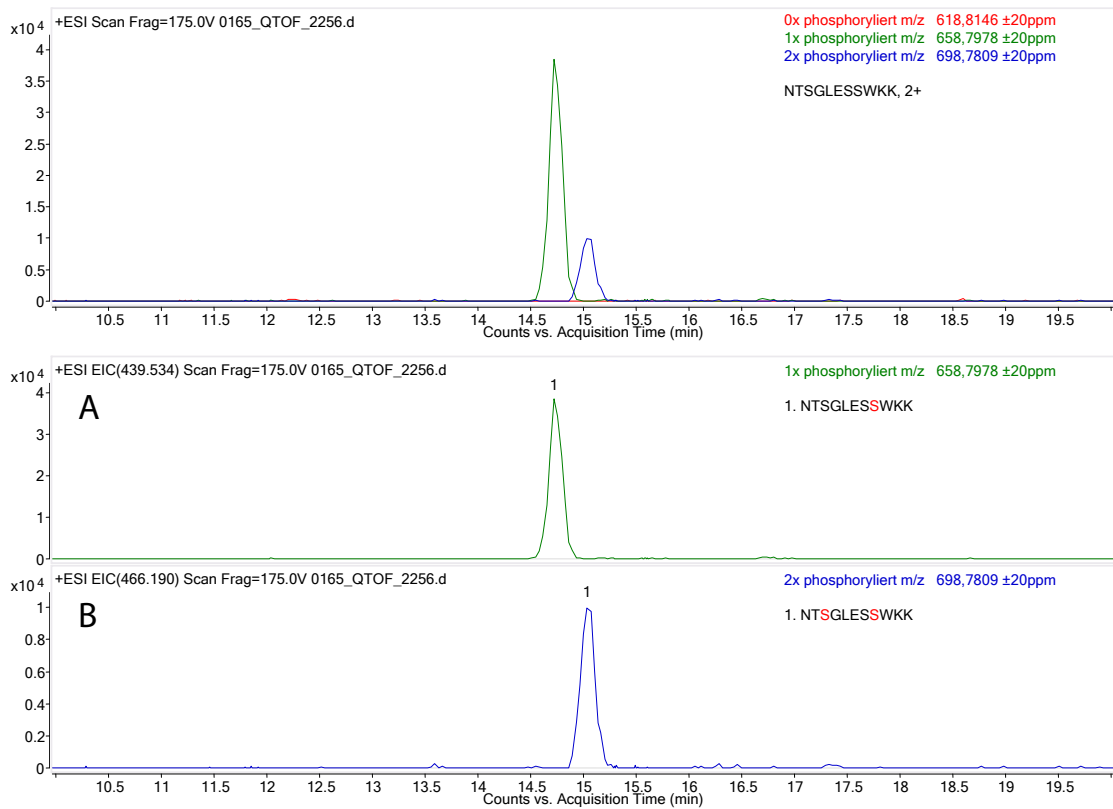


A | 1× phosphoryliertes Peptid  
 B | 2× phosphoryliertes Peptid

C | 3× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 14** – Analyse der Phosphoisomere von EDMASGPESLDGAAGGLS QKEKGPLQKL von mPER2 (1×Methioninoxidation)

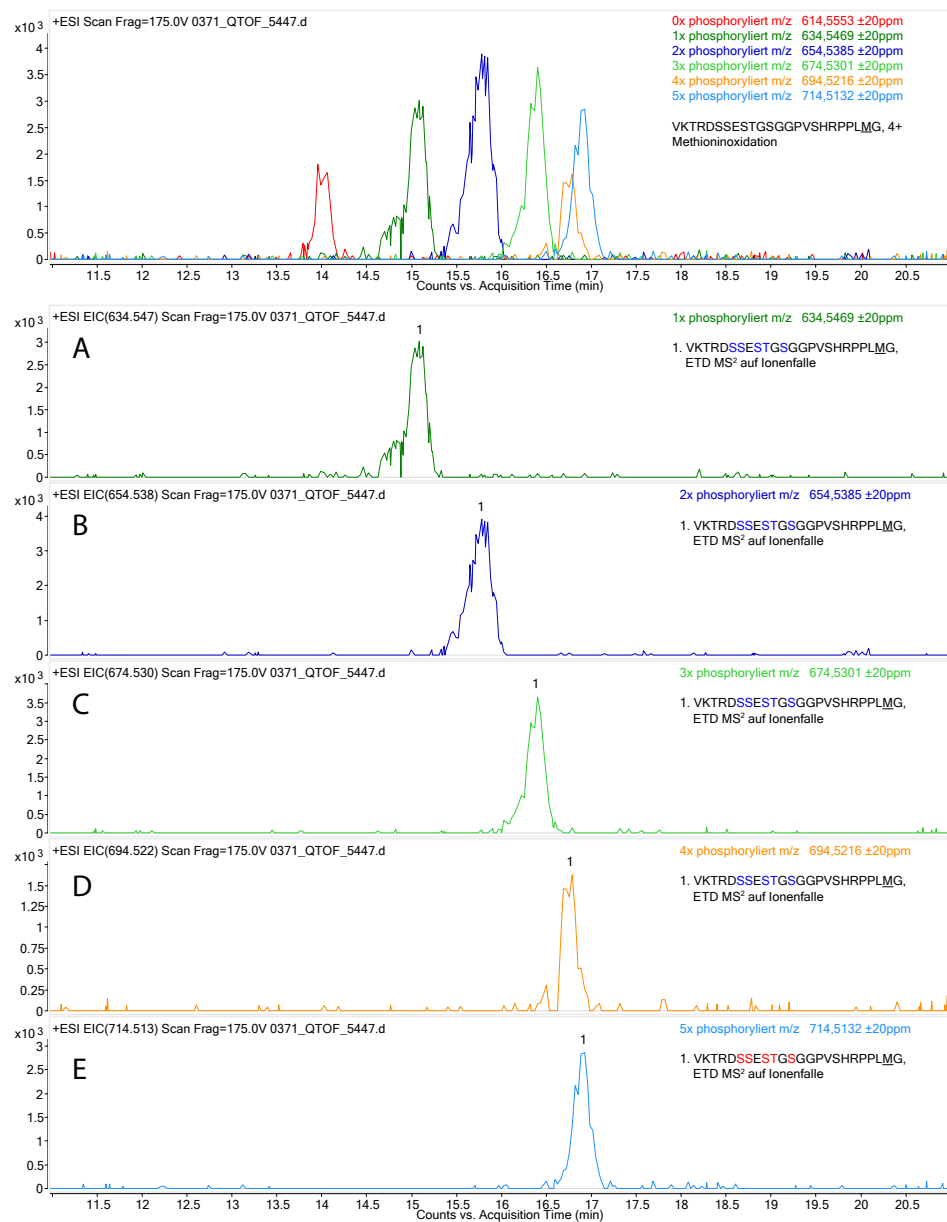
## Phosphorylierung des Clusters h (771–776) von mPER2



A | 1× phosphoryliertes Peptid  
B | 2× phosphoryliertes Peptid

Abbildung 15 – Analyse der Phosphoisomere von NTSGLESSWKK von mPER2

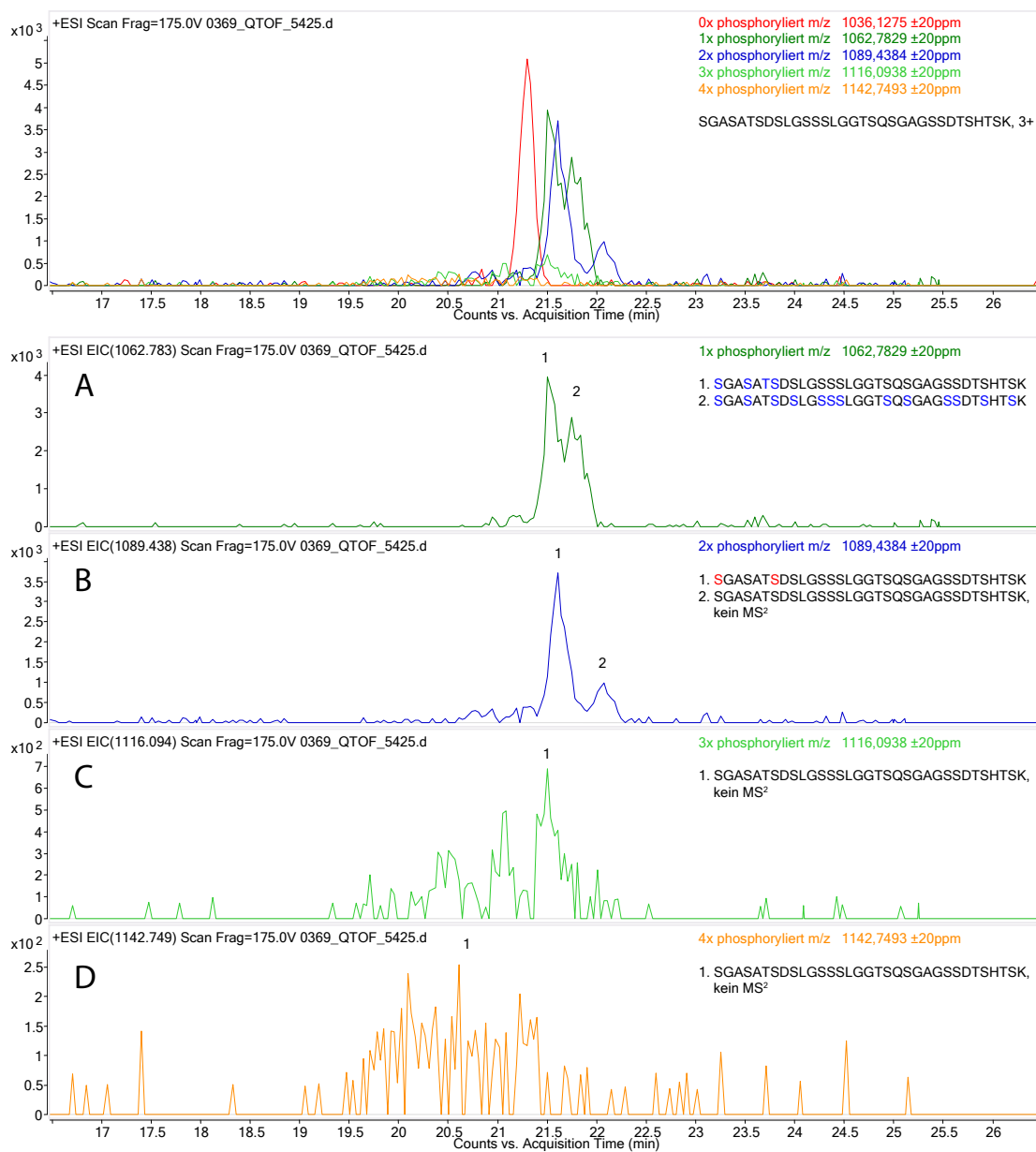
## Phosphorylierung des Clusters i (796–802) von mPER2



A   1× phosphor. Peptide	C   3× phosphor. Peptide	E   5× phosphor. Peptide
B   2× phosphor. Peptide	D   4× phosphor. Peptide	

**Abbildung 16** – Analyse der Phosphoisomere von VKTRDSSESTGSGGPVSHRPPLMG von mPER2 (1×Methioninoxidation), die Phosphorylierungsstellen konnten nur mittels eines ETD-Fragmentspektrums an der Ionenfalle identifiziert werden

## Phosphorylierung des Clusters j (1068–1102) von mPER2

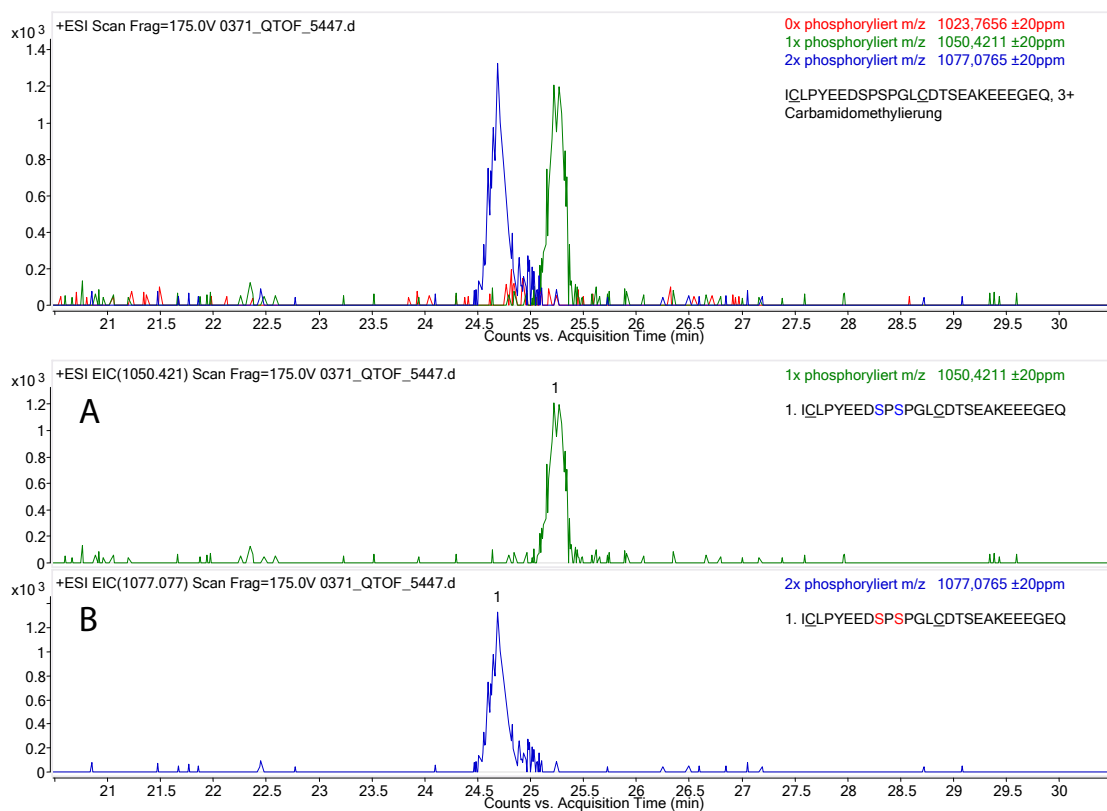


A | 1× phosphoryliertes Peptid  
B | 2× phosphoryliertes Peptid

C | 3× phosphoryliertes Peptid  
D | 4× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 17** – Analyse der Phosphoisomere von SGASATSDSLGSSSLGGTSQSGAGSSDTSHTSK von mPER2

## Phosphorylierung des Clusters k (1229–1231) von mPER2



- A | 1× phosphoryliertes Peptid  
 B | 2× phosphoryliertes Peptid

**Abbildung 18** – Analyse der Phosphoisomere von ICLPYEEDSPSPGLCDTSEAKEEEGEQ von mPER2 (2 ×Carbamidomethylierung)

## 4 Sequenzen der verwendeten Peptidstandards

### [Glu1] - Fibrinopeptide B

EGVNDNEEGFFSAR

### RASPPLFQSR phosphoryliert & unphosphoryliert (AQUA-Peptid)

RASPPLFQSR

RA<sup>p</sup>SPPLFQSR

RA<sup>p</sup>SPPLFQSR (6×<sup>13</sup>C/4×<sup>15</sup>N Arg)

### RASPPLFQSR Fehlsequenz (AQUA-Peptid)

RASPPLFQSR

### SNTHPSPDDAFR phosphoryliert & unphosphoryliert (AQUA-Peptid)

SNTHPSPDDAFR

SNTH<sup>p</sup>SPDDAFR

SNTHPSPDDAFR (6×<sup>13</sup>C/4×<sup>15</sup>N Arg)

SNTH<sup>p</sup>SPDDAFR (6×<sup>13</sup>C/4×<sup>15</sup>N Arg)

### SNTHPPSPDDAFR Fehlsequenz (AQUA-Peptid)

SNTHPPSPDDAFR

### Peptide m/z 502 & 542 (Peptidmix A)

EAISAAPFAK-NH<sub>2</sub>

EAI<sup>p</sup>SAAPFAK-NH<sub>2</sub>

### Peptide m/z 509 & 549 (Peptidmix B)

EAITAAPFAK-NH<sub>2</sub>

EAI<sup>p</sup>TAAPFAK-NH<sub>2</sub>

Tabelle 1 – Sequenzen der verwendeten Peptidstandards



**HLADLSK phosphoryliert**

HLADL<sub>p</sub>SK

**NVLPYK phosphoryliert**

NVLP<sub>p</sub>YK

**VNQIGTLSESIK 1-2 × phosphoryliert**

VNQIG<sub>p</sub>TLSESIK

VNQIG<sub>p</sub>TLSE<sub>p</sub>SIK

**VVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHK 2 × phosphoryliert**

VVEEINGNN<sub>p</sub>YV<sub>p</sub>YIDPTQLPYDHK

**FSIAPSSLDPSNR 3-4 × phosphoryliert**

F<sub>p</sub>SIAP<sub>p</sub>SLDP<sub>p</sub>SNR

F<sub>p</sub>SIAP<sub>p</sub>S<sub>p</sub>SLDP<sub>p</sub>SNR

**Tabelle 2** – Sequenzen der Peptide des 7P-Mixes

## 5 Sequenzen der verwendeten Proteinstandards

### P05132: cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha (Mouse)

1	MGNAAAAKKG	SEQESVKEFL	AKAKEDFLKK	WETPSQNTAQ	LDQFDRIKTL
51	GTGSFGRVML	VKHKESGNHY	AMKILDKQKV	VKLKQIEHTL	NEKRILQAVN
101	FPFLVKLEFS	FKDNSNLYMV	MEYVAGGEMF	SHLRRIGRFS	EPHARFYAAQ
151	IVLTFEYLHS	LDLIYRDLKP	ENLLIDQQGY	IQVTDFGFAK	RVKGRWTWLC
201	GTPEYLAPEI	ILSKGYNKAV	DWWALGVLIY	EMAAGYPPFF	ADQPIQIYEK
251	IVSGKVRFPS	HFSSDLKDLL	RNLLQVDLTK	RFGNLKNGVN	DIKNHKWFAT
301	TDWIAIYQRK	VEAPFIPKFK	GPGDTSNFDD	YEEEEIRVSI	NEKCGKEFTE
351	F				

### P02769: Serum albumin - Bos taurus (Bovine)

1	MKWVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA
51	FSQYLQQCPF	DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK
101	VASLRETYGD	MADCCEKQEP	ERNECFLSHK	DDSPDLPKLK	PDPNTLCDEF
151	KADEKKFWGK	YLYEIARRHP	YFYAPELLYY	ANKYNGVFQE	CCQAEDKGAC
201	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA	RLSQKFPAKE
251	FVEVTKLVD	LTKVHKECCH	GDLEECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
301	CCDKPLLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCCK	NYQEAKDAFL
351	GSFLYEYSRR	HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPH	ACYSTVFDKL
401	KHLVDEPQNL	IKQNCQFEK	LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS
451	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL	NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC
501	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP	DTEKQIKKQT
551	ALVELLKHKP	KATEEQLKTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV
601	STQTALA				

### Q29443: Serotransferrin - Bos taurus (Bovine)

1	MRPAVRALLA	CAVLGLCLAD	PERTVRWCTI	STHEANKCAS	FRENVLRILE
51	SGPFVSCVKK	TSHMDCIKAI	SNNEADAVTL	DGGLVYEAGL	KPNNLKPVVA
101	EFHGTDKNPQ	THYYAVAVVK	KDTDFKLNEL	RGKKSCHTGL	GRSAGWNIPM
151	AKLYKELPDP	QESIQRAAAN	FFSASCVPKA	DQSSFPKLCQ	LCAGKGTDKC
201	ACSNHEPYFG	YSGAFKCLME	GAGDVAFVKH	STVFDNLPNP	EDRKNYELLC
251	GDNTRKSVDD	YQECYLAMVP	SHAVVARTVG	GKEDVIWELL	NHAQEHFGKD
301	KPDNFQLFQS	PHGKDLLFKD	SADGFLKIPS	KMDFELYLGY	EYVTALQNL
351	ESKPPDSSKD	ECMVKWAIG	HQERTKCDRW	SGFSGGAIEC	ETAENTEECI
401	AKIMKGEADA	MSLDGGYLYI	AGKCGLVPVL	AENYKTEGES	CKNTPEKGYL
451	AVAVVKTSDA	NINWNNLKDK	KSCHTAVDRT	AGWNIPMGLL	YSKINNCKFD
501	EFFSAGCAPG	SPRNSSLCAL	CIGSEKGTGK	ECVPNSNERY	YGYTGAFRCL
551	VEKGDVAFVK	DQTVIQNTDG	NNNEAWAKNL	KKENFEVLCK	DGTRKPVTD

## 5 Sequenzen der verwendeten Proteinstandards

601	ENCHLARGPN	HAVVSRKDKA	TCVEKILNKQ	QDDFGKSVTD	CTSNFCLFQS
651	NSKDLLFRDD	TKCLASIAKK	TYDSYLGDDY	VRAMTNLRQC	STSKLLEACT
701	FHKP				

### P00330: Alcohol dehydrogenase 1 - *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast)

1	MSIPETQKGV	IFYESHGKLE	HKDIPVPKPK	ANELLINVKY	SGVCHTDLHA
51	WHGDWLPVK	LPLVGGHEGA	GVVVGMGENV	KGWKIGDYAG	IKWLNCSMA
101	CEYCELGNES	NCPHADLSGY	THDGSFQQYA	TADAVQAAHI	PQGTDLAQA
151	PILCAGITVY	KALKSANLMA	GHWVAISGAA	GGLGSLAVQY	AKAMGYRVLG
201	IDGGEGKEEL	FRSIGGEVFI	DFTKEKDIVG	AVLKATDGGA	HGVINVSVE
251	AAIEASTRYV	RANGTTVLVG	MPAGAKCCSD	VFNQVVK SIS	IVGSYVGNRA
301	DTREALDFFA	RGLVKSPIKV	VGLSTLPEIY	EKMEKGQIVG	RYVVDTSK

### P00722: Beta-galactosidase - *Escherichia coli* (strain K12)

1	MTMITDSLAV	VLQRRDWENP	GVTQLNRLAA	HPPFASWRNS	EEARTDRPSQ
51	QLRSLNGEWR	FAWFPAPPAV	PESWLECDLP	EADTVVPSN	WQMHGYDAPI
101	YTNVTYPITV	NPPFVPTENP	TGCYSLTFNV	DESWLQEGQT	RIIFDGVNSA
151	FHLWCNGRWV	GYGQDSRLPS	EFDLSAFLRA	GENRLAVMVL	RWSGDSYLED
201	QDMWRMSGIF	RDVSLHLKPT	TQISDFHVAT	RFNDDFSRAV	LEAEVQMCGE
251	LRDYLRVTVS	LWQGETQVAS	GTAPFGGEII	DERGGYADRV	TLRLNVENPK
301	LWSAEIPNLY	RAVVELHTAD	GTLIEAEACD	VGFREVRIEN	GLLLNKGKPL
351	LIRGVNRHEH	HPLHGQVMDE	QTMVQDILLM	KQNNFNAVRC	SHYPNHPLWY
401	TLCDRYGLYV	VDEANIETHG	MVPMNRLTDD	PRWLPAMSER	VTRMVQRDRN
451	HPSVIIWSLG	NESGHGANHD	ALYRWIKSVD	PSRPVQYEGG	GADTTATDII
501	CPMYARVDED	QPFPAVPKWS	IKKWLSLPGE	TRPLILCEYA	HAMGNSLGGF
551	AKYWQAFRQY	PRLQGGFVWD	WVDQSLIKYD	ENGNPWSAYG	GDFGDPNDR
601	QFCMNLVFA	DRTPHPALTE	AKHQQQFFQF	RLSGQTIEVT	SEYLFRHSDN
651	ELLHWMVALD	GKPLASGEVP	LDVAPQKQQL	IELPELPQPE	SAGQLWLTVR
701	VVQPNATAWS	EAGHISAWQQ	WRLAENLSVT	LPAASHAIPH	LTTSEMDFCI
751	ELGNKRWQFN	RQSGFSLQMW	IGDKKQLLTP	LRDQFTRAPL	DNDIGVSEAT
801	RIDPNAWVER	WKAAGHYQAE	AALLQCTADT	LADAVLITTA	HAWQHKGKTL
851	FISRKTYRID	GSGQMAITVD	VEVASDTPHP	ARIGLNCQLA	QVAERVNWLG
901	LGPQENYPDR	LTAACFDRWD	LPLSDMYTPY	VFPSENGLRC	GTRELNYGPH
951	QWRGDFQFNI	SRYSQQQLME	TSHRHLLHAE	EGTWLNIDGF	HMGIGGDDSW
1001	SPSVSAEFQL	SAGRYHYQLV	WCQK		

**P00698: Lysozyme C - Gallus gallus (Huhn)**

1	MRSLLILVLC	FLPLAALGKV	FGRCELAAAM	KRHGLDNYRG	YSLGNWVCAA
51	KFESNFNTQA	TNRNTDGSTD	YGILQINSRW	WCNDGRTPGS	RNLCNIPCSA
101	LLSSDITASV	NCAKKIVSDG	NGMNAWVAWR	NRCKGTDVQA	WIRGCRL

**P62894: Cytochrome c - Bos taurus (Bovine)**

1	MGDVEKGKKI	FVQKCAQCHT	VEKGGKHKTG	PNLHGLFGRK	TGQAPGFSYT
51	DANKNKGITW	GEETLMEYLE	NPKKYIPGTK	MIFAGIKKKG	EREDLIAYLK
101	KATNE				

**PER2 (Mouse) + V5-Tag & His-Tag**

1	MNGYVDFSPS	PTSPTKEPGA	PQPTQAVLQE	DVDMSSGSSG	NENCSTGRDS
51	QGSDCDDNGK	ELRMLVESSN	THPSPDDAFR	LMMTEAEHNP	STSGCSSEQS
101	AKADAHKELI	RTLKELKVHL	PADKKAKGKA	STLATLKYAL	RSVKQVKANE
151	EYYQLLSMSSE	SQPCSVDVPS	YSMEQVEGIT	SEYIVKNADM	FAVAVSLVSG
201	KILYISNQVA	SIFHCKKDAF	SDAKFVEFLA	PHDVSVFHSY	TPPYKLPPWS
251	VCSGLDSFTQ	ECMEEKSFFC	RVSVGKHHEN	EIRYQPFRTM	PYLVKVQEQQ
301	GAESQLCCLL	LAERVHSGYE	APRIPPEKRI	FTTHTPNCL	FQAVDERAVP
351	LLGYLPQDLI	ETPVLVQLHP	SDRPLMLAIH	KKILQAGGQP	FDYSPIRFRT
401	RNGEYITLDT	SWSSFIPNWS	RKISFIIGRH	KVRVGPLNED	VFAASPCPEE
451	KTPHPSVQEL	TEQIHRLLMQ	PVPHSGSSGY	GSLGSNGSHE	HLMSQTSSSD
501	SNGQEESHRR	RSGIFKTSGK	IQTKSHVSHE	SGGQKEASVA	EMQSSPPAQV
551	KAVTTIERDS	SGASLPKASF	PEELAYKNQP	PCSYQQISCL	DSVIRYLESC
601	SEAATLKRKC	EFPANIPSRK	ATVSPGLHSG	EAARPSKVTS	HTEVSAHLSS
651	LTLPGKAESV	VSLTSQCSYS	STIVHVGDKK	PQPELETVED	MASGPESLDG
701	AAGGLSQEKG	PLQKLGLTKE	VLAHTQREE	QGFLQRFREV	SRLSALQAHC
751	QNYLQERSRA	QASDRGLRNT	SGLESSWKKT	GKNRKLKSKR	VKTRDSSEST
801	GSGGPVSHRP	PLMGLNATAW	SPSDTSQSSC	PSAPFPTAVP	AYPLPVFQAP
851	GIVSTPGTVV	APPAATHTGF	TMPVVPMTGQ	PEFAVQPLPF	AAPLAPVMAF
901	MLPSYFPFPA	TPNLPQAFLP	SQPHFPAHPT	LASEITPASQ	AEFPSRTSTL
951	RQPCACPVTP	PAGTVALGRA	SPPLFQSRGS	SPLQLNLLQL	EEAPEGSTGA
1001	AGTLGTTGTA	ASGLDCTSGT	SRDRQPKAPP	TCNEPSDTQN	SDAISTSSDL
1051	LNLLLGEDLC	SATGSALSRS	GASATSDSLG	SSSLGFGTSQ	SGAGSSDTSH
1101	TSKYFGSIDS	SENNHKAKMI	PDTEESEQFI	KYVLQDPIWL	LMANTDDSIM
1151	MTYQLPSRDL	QAVLKEDQEK	LKLLQRSQPR	FTEGQRRELRL	EVHPWVHTGG
1201	LPTAIDVTGC	VYCESEEKGN	ICLPYEEDSP	SPGLCDTSEA	KEEEGEQLTG
1251	PRIEAQTKGG	RADPAFLYKV	VDLEGPRFEG	KPIPNPLLGL	DSTRTGHHHH
1301	HH				

## PER1 (Mouse) + V5-Tag &amp; His-Tag

1	MSGPLEGADG	GGDPRPGEPF	CPGGVPSPGA	PQHRPCPGPS	LADDTDANSN
51	GSSGNESNGP	ESRGASQRSS	HSSSSGNGKD	SALLETTESS	KSTNSQSPSP
101	PSSSIAYSL	SASSEQDNPS	TSGCSSEQSA	RARTQKELMT	ALRELKLRLP
151	PERRGKGRSG	TLATLQYALA	CVKQVQANQE	YYQWSLEEG	EPCAMDMSTY
201	TLEELEHITS	EYTLRNQDTF	SVAVSFLTGR	IVYISEQAGV	LLRCKRDVFR
251	GARFSELLAP	QDVGVFYGST	TPSRLPTWGT	GTSAGSGLKD	FTQEKSVFCR
301	IRGGPDRDPG	PRYQPFRLTP	YVKIRVSDG	APAQPCLLI	AERIHSGYEA
351	PRIPDPKRIF	TTRHTPSCLF	QDVDERAAPL	LGYPQDLLG	APVLLFLHPE
401	DRPLMLAIHK	KILQLAGQPF	DHSPIRFCAR	NGEYVTMDTS	WAGFVHPWSR
451	KVAFVLGRHK	VRTAPLNEDV	FTPPAPSPAP	SLDSDIQELS	EQIHRLLLQP
501	VHSSSPTGLC	GVGPLMSPGP	LHSPGSSSDS	NGGDAEGPGP	PAPVTFQQIC
551	KDVHLVKHQG	QQLFIESRAK	PPPRPRLLAT	GTFKAKVLPC	QSPNPELEVA
601	PVPDQASLAL	APEEPERKET	SGCSYQQINC	LDSILRYLES	CNIPSTTKRK
651	CASSSSYTAS	SASDDDKQRA	GPVPVGAKKD	PSSAMLSGEG	ATPRKEPVVG
701	GTLSPALAN	KAESVSVTS	QCSFSSTIVH	VGDKKPPESD	IIMEDLPGL
751	APGPAPSPAP	SPTVAPDPTP	DAYRPVGLTK	AVLSLHTQKE	EQAFNLNFRD
801	LGRLRGLDTS	SVAPSAPGCH	HGPIPPGRRH	HCRSKAKRSR	HHHHQTPRPE
851	TPCYVSHPSK	VPSSGPWPPP	PATTPFPAMV	QPYPLPVFSP	RGGPQPLPPA
901	PTSVSPATFP	SPLVTPMVAL	VLPNYLFPTP	PSYPYGVSA	PVEGPPTPAS
951	HSPSPSLPPP	PLSPPHRPDS	PLFNSRCSSP	LQLNLLQLEE	SPRTEGGAAA
1001	GGPGSSAGPL	PPSEETAEP	ARLVEVTESS	NQDALSGSSD	LLELLLQEDS
1051	RSGTGSAASG	SLGSGLGSGS	GSGSHEGGST	SASITRSSQS	SHTSKYFGSI
1101	DSSEAEAGAA	RARTEPGDQV	IKCVLQDPIW	LLMANADQRV	MMTYQVPSRD
1151	AASVLKQDRE	RLRAMQKQQP	RFSEDQRREL	GAVHSWVRKG	QLPRALDVTA
1201	CVDCGSSVQD	PGHSDDPLFS	ELDGLGLEPM	EEGGGEGGGC	GVGGGGGDGG
1251	EEAQTIGAK	GSSSQDSAME	EEEQGGGSSS	PALPAEENST	SKGGRADPAF
1301	LYKVVDLEGP	RFEGKPIPNP	LLGLDSTRTG	HHHHHH	

Tabelle 3 – Proteinsequenzen der verwendeten Standardproteine

## 6 Ergebnisse des ersten Versuchs mPER2 und PP2A (<sup>15</sup>N-Labeling)

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
MLVSSNTHPSPDDAFR	-	-	3+	1,47
MLVSSNTHPSPDDAFR	2	-	3+	1,52
MLVSSNTHPSPDDAFR	2	S-74	3+	1,41
MLVSSNTHPSPDDAFR	-	S-74	3+	1,49
LMMTEAEHNPSTSGCSSEQSAK	2,2,1	-	3+	1,46
LMMTEAEHNPSTSGCSSEQSAK	2,1	-	3+	1,57
LMMTEAEHNPSTSGCSSEQSAK	1	-	3+	1,47
LMMTEAEHNPSTSGCSSEQSAK	2,2,1	-	3+	1,49
ILYISNQVASIFHCK	1	-	3+	1,31
SFFCR	1	-	2+	1,48
YQPFR	-	-	2+	1,57
MTPYLVK	-	-	2+	1,50
MTPYLVK	2	-	2+	1,51
VQEQQGAESQLCCLLLAER	1,1	-	2+	1,32
VQEQQGAESQLCCLLLAER	1,1	-	3+	1,43
IFTTHTPNCLFQAVDER	1	-	3+	1,47
ILQAGGQPFDDYSPIR	-	-	2+	1,51
KISFIIGR	-	-	3+	1,56
VGPLNEDVFAASPCPEEK	1	-	2+	1,48
VGPLNEDVFAASPCPEEK	1	-	3+	1,47
TPHPSVQELTEQIHR	-	-	3+	1,53
TPHPSVQELTEQIHR	-	-	4+	1,55
EASVAEMQSSPPAQVK	2	-	2+	1,40
EASVAEMQSSPPAQVK	2	-	3+	1,47
EASVAEMQSSPPAQVK	2	S-545	2+	1,31
EASVAEMQSSPPAQVK	-	S-545	3+	1,42
AVTTIERDSSGASLPK	-	S-564	3+	1,50
AVTTIERDSSGASLPK	-	S-560 S-561 S-564	3+	1,69
ASFPEELAYK	-	-	2+	1,56
NQPPCSYQQISCLDSVIR	1,1	-	3+	1,56
NQPPCSYQQISCLDSVIR	1,1	-	2+	1,40
YLESCSEAATLKR	1	-	2+	1,31
KCEFPANIPSR	1	-	3+	1,54
KATVSPGLHSGEAARPSK	-	-	4+	1,62
KATVSPGLHSGEAARPSK	-	S-624	4+	1,68
KATVSPGLHSGEAARPSK	-	-	5+	1,44
KATVSPGLHSGEAARPSK	-	-	5+	1,36
ATVSPGLHSGEAARPSK	-	-	3+	1,47
ATVSPGLHSGEAARPSK	-	S-624	4+	1,45
VTSHTEVSAHLSSLTPGK	-	-	4+	1,39
KPQPELETVEDMASGPESLDGAAGGLSSEQK	2	-	3+	1,40

Fortsetzung auf nächster Seite

6 Ergebnisse des ersten Versuchs mPER2 und PP2A ( $^{15}\text{N}$ -Labeling)

Fortgesetzt von letzter Seite

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
EEQGFLQR	-	-	2+	1,57
NTSGLESSWKK	-	S-776	3+	1,61
NTSGLESSWKK	-	S-776	2+	1,58
QPCACPVTPPAGTVALGR	1,1	-	2+	1,32
ASPPLFQSR	-	S-971	2+	1,53
ASPPLFQSR	-	S-971	2+	1,35
SGASATSDSLGSSSLGFGTSQSGAGSSDTSHTSK	-	-	3+	1,60
YFGSIDSENHHK	-	-	3+	1,44
YFGSIDSENHHK	-	-	3+	1,48
MIPDTEESEQFIK	2	-	2+	1,55
MIPDTEESEQFIK	-	-	2+	1,48
MIPDTEESEQFIK	2	-	2+	1,46
DLQAVLKEDQEK	-	-	2+	1,64
DLQAVLKEDQEK	-	-	3+	1,56
DLQAVLKEDQEK	-	-	3+	1,63
FEGKPIPNPLLGLDSTR	-	-	3+	1,56
Mittelwert (Standardabweichung)				1,48 ( $\pm 0,10$ )

**Tabelle 4** – mPER2  $^{15}\text{N}$ -Quantifizierung des Trypsinverdaus (erster Versuch)

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
MNGYVDFSPSPTSP <sup>T</sup> KEPGAPQPT	4,3	S-13	3+	1,22
MNGYVDFSPSPTSP <sup>T</sup> KEPGAPQPT	4,3	S-8 S-13	3+	1,43
SPTKEPGAPQPT	-	-	2+	1,69
SNTHPSPDDAFRL	-	-	3+	1,42
DAHKEIIRT	-	-	3+	1,60
KANEEYYQLL	-	-	2+	1,43
KVQEQQGAESQLCCL	1,1	-	2+	1,49
SPCPEEKTPHPS	1	-	3+	1,51
SPCPEEKTPHPS	1	-	2+	1,53
SPCPEEKTPHPS	1	-	3+	1,50
SVAEMQSSPPAQV	2	-	2+	1,52
SVAEMQSSPPAQV	2	S-545	2+	1,39
AYKNQPPCSYQQI	1	-	2+	1,48
RYLESCSEAA	1	-	2+	1,56
TVSPGLHSGEAAARPS	-	S-624	3+	1,51
TVSPGLHSGEAAARPS	-	-	3+	1,48
TVSPGLHSGEAAARPS	-	S-624	2+	1,51
EDMASGPESLDGAAGGLSQEKGPLQKL	2	S-693 S-697	3+	1,47
SHRPPLMGLNAT	2	-	3+	1,51
SQAEFPSRT	-	-	2+	1,50

Fortsetzung auf nächster Seite

# Anhang

Fortgesetzt von letzter Seite

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
RASPPPLFQSRGSSPLQL	-	S-971 S-980 S-981	3+	1,46
RASPPPLFQSRGSSPLQL	-	S-971 S-980	3+	1,52
YQLPSRDLQAV	-	-	2+	1,58
Mittelwert (Standardabweichung)				1,49 ( $\pm 0,09$ )

**Tabelle 5** – mPER2 <sup>15</sup>N-Quantifizierung des Elastaseverdaus (erster Versuch)

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
VDFSPSPTSP <sup>T</sup> KEPGAPQPTQA	-	T-15	3+	1,40
VDFSPSPTSP <sup>T</sup> KEPGAPQPTQA	-	S-13 T-15	3+	1,48
FSPSPTSP <sup>T</sup> KEPGAPQPTQA	-	-	2+	1,59
FSPSPTSP <sup>T</sup> KEPGAPQPTQA	-	T-15	2+	1,36
LVESNTHPSPDDAFR	-	-	3+	1,39
LVESNTHPSPDDAFR	-	S-74	3+	1,35
LVESNTHPSPDDAFR	-	-	3+	1,45
LVESNTHPSPDDA	-	-	2+	1,39
VDVPSYSMEQVEG	-	-	2+	1,36
LAPHDVSVFHS	-	-	3+	1,42
FTQECMEKSF	1	-	2+	1,27
LVKVQEQQGAESQ	-	-	2+	1,50
LVKVQEQQGAESQ	-	-	2+	1,44
LVKVQEQQGAESQ	-	-	3+	1,42
LVKVQEQQGAESQ	-	-	3+	1,41
AVDERAVPL	-	-	2+	1,39
VRVGPLNEDVFA	-	-	2+	1,48
AASPCPEEKTPHPS	1	-	3+	1,52
AASPCPEEKTPHPS	1	-	3+	1,52
ASPCPEEKTPHPS	1	-	3+	1,47
ASPCPEEKTPHPS	1	-	3+	1,56
LMQVPVPHSGSSGYGS	2	-	2+	1,50
LMQVPVPHSGSSGYGS	-	-	2+	1,40
IERSGASLPKA	-	-	3+	1,47
IERSGASLPKA	-	-	3+	1,44
LAYKNQPPCSYQQ	1	-	2+	1,51
VGDKKPQPELETVEDMASGPESLDGAAGG	2	S-693 S-697	3+	1,44
VGDKKPQPELETVEDMASGPES	2	-	3+	1,49
VEDMASGPESLDGAAGGLSQEKGPLQK	2	S-693 S-697	3+	1,39
LDGAAGGLSQEKGPLQK	-	-	3+	1,44
IVSTPGTVVAPPAATHTG	-	-	2+	1,45
VVAPPAATHTG	-	-	2+	1,56

Fortsetzung auf nächster Seite



6 Ergebnisse des ersten Versuchs mPER2 und PP2A ( $^{15}\text{N}$ -Labeling)

Fortgesetzt von letzter Seite

Peptid	Mod	Phospho	z	Verh. <small>Leicht/Schwer</small>
LASEITPASQAEFPSRT	-	-	2+	1,32
ITPASQAEFPSRT	-	-	2+	1,41
LRQPCACPVTPPAGT	1,1	T-959	3+	2,06
LGRASPPLFQSRGSSPLQ	-	S-971 S-977 S-980 S-981	3+	1,47
LGRASPPLFQ	-	S-971	2+	1,49
LGRASPPL	-	S-971	2+	1,59
LLQLEEAPGEGSTGAAGT	-	-	2+	1,52
LLQLEEAPGEGSTGAAGT	-	S-997	2+	1,46
LLGEDLCSATGSA	1	-	2+	1,52
LSRSGASATSDSLGSSS	-	-	2+	1,46
LGFGTSQSGAGSSDTSHTSKY	-	-	3+	1,38
FGTSQSGAGSSDTSHTSKY	-	-	3+	1,48
ICLPYEEDSPSPG	1	-	2+	1,40
ICLPYEEDSPSPG	1	S-1231	2+	1,51
LCDTSEAKEEEGEQ	1	-	2+	1,46
IEAQTGGRADPAF	-	-	3+	1,48
IEAQTGGRADPAF	-	-	3+	1,55
Mittelwert (Standardabweichung)				1,47 ( $\pm 0,12$ )

**Tabelle 6** – mPER2  $^{15}\text{N}$ -Quantifizierung des Thermolysinverdaus (erster Versuch)

## 7 Pepview-Ergebnisse Dionex Mix unbehandelt - behandelt mit HCl

Tabelle 7 – Bovine serum albumin (Rind) unbehandelt - behandelt HCl 5 h 30 min 15 °C

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln→pyro-Glu(N-termQ)	Oxidation (M)	Carboxymethyl (C)
	1 - 50	MKQWTFISLLLLFSSAYSRGVFRDRTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLI A				
H2O	35 - 44	FKDLGEEHFK	63.3			
HCL	35 - 44	FKDLGEEHFK	62.8			
HCL	35 - 44	FKDLGEEHFK	61.7			
H2O	35 - 44	FKDLGEEHFK	52.3			
H2O	35 - 44	FKDLGEEHFK	41.6			
HCL	35 - 44	FKDLGEEHFK	39.1			
H2O	37 - 44	DLGEEHFK	30.5			
H2O	37 - 44	DLGEEHFK	22			
	51 - 100	FSQYLQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCK				
H2O	52 - 65	SQYLQQCPFDEHVK	65.5			C-58
H2O	52 - 65	SQYLQQCPFDEHVK	62.5			C-58
HCL	52 - 65	SQYLQQCPFDEHVK	53.7			C-58
HCL	52 - 65	SQYLQQCPFDEHVK	47.5			C-58
H2O	66 - 75	LVNELTEFAK	65.4			
HCL	66 - 75	LVNELTEFAK	64.9			
HCL	66 - 75	LVNELTEFAK	42.4			
HCL	66 - 75	LVNELTEFAK	32.4			
H2O	66 - 75	LVNELTEFAK	29.9			
H2O	66 - 75	LVNELTEFAK	27.4			
H2O	76 - 88	TCVADESHAGCEK	76.2			C-77 C-86
HCL	76 - 88	TCVADESHAGCEK	39.4			C-77 C-86
H2O	89 - 100	SLHTLFGDELCK	92.8			C-99
HCL	89 - 100	SLHTLFGDELCK	89.8			C-99
H2O	89 - 100	SLHTLFGDELCK	58.7			C-99
HCL	89 - 100	SLHTLFGDELCK	50.5			C-99
HCL	89 - 100	SLHTLFGDELCK	46			C-99
HCL	89 - 100	SLHTLFGDELCK	34.8			C-99
HCL	92 - 100	TLFGDELCK	25			C-99
	101 - 155	VASLRETYGDMADCEKQEPERNECFLSHKDDSPDLPKLKPDPNTLCDEFKADEK				
H2O	106 - 122	ETYGDMADCEKQEPER	133.9			C-114 C-115
HCL	106 - 122	ETYGDMADCEKQEPER	100.5			C-114 C-115
H2O	106 - 122	ETYGDMADCEKQEPER	44.2	M-111		C-114 C-115
HCL	106 - 117	ETYGDMADCEK	79.5			C-114 C-115
H2O	106 - 117	ETYGDMADCEK	79.2			C-114 C-115
H2O	106 - 117	ETYGDMADCEK	57.7			C-115
H2O	106 - 117	ETYGDMADCEK	38.2	M-111		C-114 C-115
HCL	106 - 117	ETYGDMADCEK	36	M-111		C-114 C-115
HCL	106 - 117	ETYGDMADCEK	24.7			C-115
H2O	118 - 138	QEPERNECFLSHKDDSPDLPK	43.3			C-125
H2O	118 - 138	QEPERNECFLSHKDDSPDLPK	39.6			C-125
H2O	118 - 130	QEPERNECFLSHK	45.1			C-125
H2O	118 - 130	QEPERNECFLSHK	37	Q-118		C-125
H2O	118 - 130	QEPERNECFLSHK	26			C-125
H2O	123 - 138	NECFLSHKDDSPDLPK	83.5			C-125
H2O	123 - 138	NECFLSHKDDSPDLPK	62.9			C-125
HCL	123 - 138	NECFLSHKDDSPDLPK	41.3			C-125
HCL	123 - 138	NECFLSHKDDSPDLPK	40.4			C-125
H2O	123 - 138	NECFLSHKDDSPDLPK	38.6			C-125
H2O	123 - 130	NECFLSHK	30.7			C-125
H2O	131 - 138	DDSPDLPK	30.4			
H2O	139 - 155	LKPDPNTLCDEFKADEK	63.4			C-147
HCL	139 - 155	LKPDPNTLCDEFKADEK	57.6			C-147
HCL	139 - 155	LKPDPNTLCDEFKADEK	55.2			C-147
H2O	139 - 155	LKPDPNTLCDEFKADEK	55.1			C-147
HCL	139 - 155	LKPDPNTLCDEFKADEK	38.7			C-147

Fortsetzung auf nächster Seite

## 7 Pepview-Ergebnisse Dionex Mix unbehandelt - behandelt mit HCl

Fortgesetzt von letzter Seite

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln->pyro-Glu (N-termQ)	Oxidation (M)	Carboxymethyl (C)
HCL	139 - 155	LKPDPTNLCDEFKADEK	29.9			C-147
H2O	139 - 151	LKPDPTNLCDEFK	97.7			C-147
H2O	139 - 151	LKPDPTNLCDEFK	82.1			C-147
HCL	139 - 151	LKPDPTNLCDEFK	72.7			C-147
HCL	139 - 151	LKPDPTNLCDEFK	22.6			C-147
H2O	145 - 155	TLCDEFKADEK	49.3			C-147
HCL	145 - 155	TLCDEFKADEK	28.4			C-147
HCL	145 - 151	TLCDEFK	22.5			C-147
	156 - 218	KFWGKYLVEIARRHPYFYAPPELLYYANKYNGVFQECQQAEDKGACLLPKIETMREKVLASSAR				
HCL	161 - 167	YLVEIAR	39.3			
H2O	161 - 167	YLVEIAR	38.8			
HCL	172 - 183	FYAPPELLYYANK	69			
H2O	172 - 183	FYAPPELLYYANK	57.5			
H2O	172 - 183	FYAPPELLYYANK	39.8			
HCL	174 - 183	APELLYYANK	35.5			
HCL	184 - 197	YNGVFQECQQAEDK	73.6			C-191 C-192
HCL	184 - 197	YNGVFQECQQAEDK	68.4			C-191 C-192
H2O	184 - 197	YNGVFQECQQAEDK	66.8			C-191 C-192
H2O	184 - 197	YNGVFQECQQAEDK	60.8			C-191 C-192
HCL	187 - 197	VFQECQQAEDK	26.6			C-191 C-192
HCL	198 - 204	GACLLPK	44.6			C-200
H2O	198 - 204	GACLLPK	44.5			C-200
	219 - 256	QRLRCASIQKFGERALKAWSVARLSQKFPKAEFVEVTK				
H2O	249 - 256	AEFVEVTK	39.1			
HCL	249 - 256	AEFVEVTK	36.2			
	257 - 309	LVTDLTQVHKECCHGDLLCADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKPILLEK				
H2O	257 - 263	LVTDLTQ	41.6			
HCL	257 - 263	LVTDLTQ	31			
H2O	264 - 285	VHKECCHGDLLCADDRADLAK	32.6			C-268 C-269 C-276
HCL	264 - 285	VHKECCHGDLLCADDRADLAK	27.8			C-268 C-269 C-276
HCL	264 - 280	VHKECCHGDLLCADDR	103.7			C-268 C-269 C-276
H2O	264 - 280	VHKECCHGDLLCADDR	99			C-268 C-269 C-276
H2O	264 - 280	VHKECCHGDLLCADDR	72.7			C-268 C-269 C-276
H2O	264 - 280	VHKECCHGDLLCADDR	48.5			C-268 C-269 C-276
HCL	264 - 280	VHKECCHGDLLCADDR	38.7			C-268 C-269 C-276
H2O	267 - 280	ECCHGDLLCADDR	56.9			C-268 C-269 C-276
HCL	271 - 280	GDLLCADDR	24			C-276
H2O	286 - 297	YICDNQDTISSK	74.1			C-288
HCL	286 - 297	YICDNQDTISSK	74			C-288
HCL	286 - 297	YICDNQDTISSK	29.8			C-288
HCL	286 - 297	YICDNQDTISSK	20.4			C-288
H2O	298 - 309	LKECCDKPILLEK	84.3			C-301 C-302
HCL	298 - 309	LKECCDKPILLEK	66.7			C-301 C-302
HCL	298 - 309	LKECCDKPILLEK	57.3			C-301 C-302
H2O	298 - 309	LKECCDKPILLEK	57.2			C-301 C-302
H2O	298 - 309	LKECCDKPILLEK	57.2			C-301 C-302
HCL	298 - 309	LKECCDKPILLEK	56.6			C-301 C-302
	302 - 359	CDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAQDAFLGSLFLEYYSR				
HCL	329 - 340	TADFAEDKDVCK	81.6			C-339
HCL	329 - 340	TADFAEDKDVCK	79.5			C-339
H2O	350 - 359	LGSFLLEYYSR	59.2			
HCL	350 - 359	LGSFLLEYYSR	26.3			
	352 - 400	SFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAKDDPHACYSTVFDKL				
HCL	352 - 359	SFLYEYSR	27.7			
HCL	360 - 371	RHPEYAVSVLLR	57.6			
H2O	360 - 371	RHPEYAVSVLLR	52.5			
HCL	360 - 371	RHPEYAVSVLLR	23.8			
HCL	361 - 371	HPEYAVSVLLR	44.1			
H2O	361 - 371	HPEYAVSVLLR	37.8			
HCL	361 - 371	HPEYAVSVLLR	25.5			
H2O	375 - 386	EYEATLEECCA	68.2			C-383 C-384

Fortsetzung auf nächster Seite

# Anhang

Fortgesetzt von letzter Seite

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln->pyro-Glu (N-termQ)	Oxidation (M)	Carboxymethyl <sup>1</sup> (C)
HCL	375 - 386	EYEATLEECCA	57			C-383 C-384
HCL	375 - 386	EYEATLEECCA	41.5			C-383 C-384
H20	375 - 386	EYEATLEECCA	35			C-383 C-384
HCL	375 - 386	EYEATLEECCA	22.6			C-383 C-384
H20	387 - 399	DDPHACYSTVFDK	89.8			C-392
H20	387 - 399	DDPHACYSTVFDK	84			C-392
HCL	387 - 399	DDPHACYSTVFDK	70.6			C-392
HCL	387 - 399	DDPHACYSTVFDK	65			C-392
H20	401 - 451	KHLVDEPQNLIKQNCQFEKLGEGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSR	71.7			
HCL	402 - 412	HLVDEPQNLIK	62.6			
H20	402 - 412	HLVDEPQNLIK	58.5			
HCL	402 - 412	HLVDEPQNLIK	46.4			
H20	413 - 420	QNCQFEK	32.6	Q-413		C-415
HCL	413 - 420	QNCQFEK	32	Q-413		C-415
HCL	421 - 433	LGEYGFQNALIVR	114.6			
H20	421 - 433	LGEYGFQNALIVR	100.1			
HCL	421 - 433	LGEYGFQNALIVR	26.8			
H20	421 - 433	LGEYGFQNALIVR	20.8			
HCL	423 - 433	EYGFQNALIVR	39.5			
H20	437 - 451	KVPQVSTPTLVEVSR	100.9			
HCL	437 - 451	KVPQVSTPTLVEVSR	90.9			
H20	437 - 451	KVPQVSTPTLVEVSR	66.1			
HCL	437 - 451	KVPQVSTPTLVEVSR	51.1			
HCL	437 - 451	KVPQVSTPTLVEVSR	38.3			
HCL	437 - 451	KVPQVSTPTLVEVSR	33.6			
H20	438 - 451	VPQVSTPTLVEVSR	37.1			
H20	438 - 451	VPQVSTPTLVEVSR	32.8			
HCL	443 - 451	TPTLVEVSR	54.2			
H20	444 - 451	PTLVEVSR	28.3			
HCL	452 - 507	SLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNR	20			
HCL	477 - 482	SLILNR	46.3			C-484
H20	483 - 489	LCVLHEK	30.5			C-484
HCL	483 - 489	LCVLHEK	30.4			C-484
H20	483 - 489	LCVLHEK	28.7			C-484
H20	499 - 507	CCTESLVNR	64.2			C-499 C-500
HCL	499 - 507	CCTESLVNR	60.5			C-499 C-500
HCL	499 - 507	CCTESLVNR	27			C-499 C-500
H20	507 - 557	RRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTHADICTLPDTEKQIKKQTALVELLK	52.1			C-510
HCL	508 - 523	RPCFSALTPDETYVPK	48			C-510
HCL	508 - 523	RPCFSALTPDETYVPK	40.2			C-510
H20	508 - 523	RPCFSALTPDETYVPK	32.7			C-510
HCL	508 - 523	RPCFSALTPDETYVPK	21.9			C-510
HCL	508 - 518	RPCFSALTPDE	26.7			C-510
HCL	508 - 514	RPCFSAL	42.6			C-510
H20	510 - 523	CFSALTPDETYVPK	24.5			C-510
HCL	512 - 523	SALTPDETYVPK	26			
H20	533 - 544	HADICTLPDTEK	51.3			C-537
H20	533 - 544	HADICTLPDTEK	34			C-537
H20	534 - 544	ADICTLPDTEK	50.8			C-537
HCL	545 - 557	QIKKQTALVELLK	25.6	Q-545		
H20	548 - 557	KQTALVELLK	60.1			
HCL	548 - 557	KQTALVELLK	55.8			
H20	548 - 557	KQTALVELLK	45			
HCL	548 - 557	KQTALVELLK	30.5			
HCL	548 - 557	KQTALVELLK	28.3			
H20	549 - 557	QTALVELLK	64.8			
HCL	549 - 557	QTALVELLK	63.1			
H20	549 - 557	QTALVELLK	54.6	Q-549		
HCL	549 - 557	QTALVELLK	47.2	Q-549		
HCL	549 - 557	QTALVELLK	35.3	Q-549		
HCL	549 - 557	QTALVELLK	31.7			

Fortsetzung auf nächster Seite

## 7 Pepview-Ergebnisse Dionex Mix unbehandelt - behandelt mit HCl

Fortgesetzt von letzter Seite

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln->pyro-Glu (N-termQ)	Oxidation (M)	Carboxymethyl (C)
HCL	550 - 557	TALVELLK	30.1			
	552 - 607	LVELLKHKPKATEEQLKVTMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA				
H2O	581 - 597	CCAADDKEACFAVEGPK	123.5		C-581	C-582 C-590
HCL	581 - 597	CCAADDKEACFAVEGPK	119.8		C-581	C-582 C-590
H2O	581 - 597	CCAADDKEACFAVEGPK	73.3		C-581	C-582 C-590
H2O	588 - 597	EACFAVEGPK	62.4			C-590
HCL	588 - 597	EACFAVEGPK	51.9			C-590

Tabelle 8 – Apo-Transferine (Rind) unbehandelt - behandelt HCl 5 h 30 min 15 °C

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln->pyro-Glu (N-termQ)	Oxidation (M)	Carboxymethyl (C)
	1 - 60	MRPAVRALLACAVLGLCLADPERTVRWCTISTHEANKASFRENVLRILES GPFVSCVKK				
H2O	27 - 37	WCTISTHEANK	54.4			C-28
H2O	27 - 37	WCTISTHEANK	40			C-28
HCL	48 - 60		65			C-57
H2O	48 - 60	ILES GPFVSCVKK	62			C-57
H2O	48 - 60	ILES GPFVSCVKK	22.6			C-57
HCL	48 - 59	ILES GPFVSCVK	98.5			C-57
H2O	48 - 59	ILES GPFVSCVK	91.6			C-57
HCL	48 - 59	ILES GPFVSCVK	30.4			C-57
HCL	48 - 59	ILES GPFVSCVK	29.8			C-57
H2O	48 - 59	ILES GPFVSCVK	29.5			C-57
	51 - 106	SGPFVSCVKKTS HMDCIKAI SNNEADAVTL DGGLVYEAGLKPNNLKPVVAEFHG TK				
HCL	51 - 60	SGPFVSCVKK	37.4			C-57
HCL	51 - 59	SGPFVSCVK	43.8			C-57
H2O	94 - 106	NLKPVVAEFHG TK	25.5			
	101 - 150	EFHG TKDNPQTHYYAVAVVKKDTDFKLNELRGKKSCHTGLGRSAGWNIPM				
HCL	107 - 120	DNPQTHYYAVAVVK	115.3			
H2O	107 - 120	DNPQTHYYAVAVVK	108.6			
H2O	107 - 120	DNPQTHYYAVAVVK	62.1			
HCL	107 - 120	DNPQTHYYAVAVVK	59.9			
HCL	107 - 120	DNPQTHYYAVAVVK	56.2			
HCL	107 - 120	DNPQTHYYAVAVVK	50.4			
HCL	107 - 120	DNPQTHYYAVAVVK	37.3			
H2O	109 - 120	PQTHYYAVAVVK	89.5			
H2O	109 - 120	PQTHYYAVAVVK	32.1			
HCL	111 - 120	THYYAVAVVK	42.6			
HCL	114 - 120	YAVAVVK	43.1			
H2O	114 - 120	YAVAVVK	31.8			
	151 - 216	AKLYKELPD PQESIQR A A A A N F F S A S C V P C A D Q S S F P K L Q L C A G K G T D K A C S N H E P Y F G Y S G A F K				
HCL	156 - 166	ELPD PQESIQR	74.5			
H2O	156 - 166	ELPD PQESIQR	67			
H2O	156 - 166	ELPD PQESIQR	52.4			
HCL	156 - 166	ELPD PQESIQR	49.6			

Fortsetzung auf nächster Seite

# Anhang

Fortgesetzt von letzter Seite

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln→pyro-Glu (N-termQ)	Oxidation (M)	Carboxymethyl (C)
HCL	156 - 166	ELPDPQESIQR	43.3			
HCL	156 - 166	ELPDPQESIQR	21.1			
H20	158 - 166	PDPQESIQR	39			
HCL	158 - 166	PDPQESIQR	34.4			
HCL	173 - 187	SASCVPCADQSSFPK	52.3			C-176 C-179
HCL	175 - 187	SCVPCADQSSFPK	50.7			C-176 C-179
HCL	188 - 195	LCQLCAGK	34.5			C-189 C-192
H20	188 - 195	LCQLCAGK	34.4			C-189 C-192
H20	196 - 216	GTDKCACSNNHEPYFGYSGAFK	48.4			C-200 C-202
HCL	196 - 216	GTDKCACSNNHEPYFGYSGAFK	41.2			C-200 C-202
H20	200 - 216	CACSNHEPYFGYSGAFK	92.5			C-200 C-202
H20	200 - 216	CACSNHEPYFGYSGAFK	56.1			C-200 C-202
HCL	200 - 216	CACSNHEPYFGYSGAFK	55.3			C-200 C-202
HCL	200 - 216	CACSNHEPYFGYSGAFK	25.9			C-200 C-202
	203 - 256	SNHEPYFGYSGAFKCLMEGAGDVAFVKHSTVFDNLPNPEDRKNYELLCGDNTRK				
HCL	203 - 216	SNHEPYFGYSGAFK	34.6			
HCL	203 - 216	SNHEPYFGYSGAFK	31.5			
HCL	217 - 229	CLMEGAGDVAFVK	99.1			C-217
H20	217 - 229	CLMEGAGDVAFVK	90.3	M-219		C-217
H20	217 - 229	CLMEGAGDVAFVK	69.3			C-217
H20	230 - 244	HSTVFDNLPNPEDRK	89.4			
HCL	230 - 244	HSTVFDNLPNPEDRK	75.8			
H20	230 - 244	HSTVFDNLPNPEDRK	73.3			
HCL	230 - 244	HSTVFDNLPNPEDRK	47.8			
HCL	230 - 244	HSTVFDNLPNPEDRK	36.7			
H20	230 - 243	HSTVFDNLPNPEDR	105			
HCL	230 - 243	HSTVFDNLPNPEDR	91.5			
H20	230 - 243	HSTVFDNLPNPEDR	52.4			
HCL	230 - 243	HSTVFDNLPNPEDR	40.4			
HCL	230 - 243	HSTVFDNLPNPEDR	23			
H20	244 - 256	KNYELLCGDNTRK	73.1			C-250
HCL	244 - 256	KNYELLCGDNTRK	55.2			C-250
HCL	244 - 256	KNYELLCGDNTRK	27			C-250
H20	244 - 256	KNYELLCGDNTRK	23			C-250
HCL	244 - 255	KNYELLCGDNTR	43			C-250
H20	245 - 256	NYELLCGDNTRK	45.3			C-250
HCL	245 - 256	NYELLCGDNTRK	25.8			C-250
H20	245 - 256	NYELLCGDNTRK	21.1			C-250
H20	245 - 255	NYELLCGDNTR	54.2			C-250
HCL	245 - 255	NYELLCGDNTR	54			C-250
HCL	245 - 255	NYELLCGDNTR	42.2			C-250
HCL	245 - 255	NYELLCGDNTR	39.2			C-250
H20	245 - 255	NYELLCGDNTR	22.2			C-250
	257 - 314	SVDDYQECYLAMVPSSHAVVARTVGGKEDVIWELLNHAQEHFGKDKPDNFQLFQSPHGK				
HCL	267 - 277	AMVPSSHAVVAR	28.3			
H20	300 - 314	DKPDNFQLFQSPHGK	115.7			
H20	300 - 314	DKPDNFQLFQSPHGK	83.1			
HCL	300 - 314	DKPDNFQLFQSPHGK	64.2			
HCL	300 - 314	DKPDNFQLFQSPHGK	62.3			
H20	300 - 314	DKPDNFQLFQSPHGK	46.2			
H20	300 - 314	DKPDNFQLFQSPHGK	32.8			
HCL	300 - 314	DKPDNFQLFQSPHGK	28			
HCL	300 - 312	DKPDNFQLFQSPH	43.3			
H20	300 - 312	DKPDNFQLFQSPH	39.6			
H20	300 - 312	DKPDNFQLFQSPH	33.6			
HCL	300 - 309	DKPDNFQLFQ	39.1			
HCL	300 - 308	DKPDNFQLF	26.5			
	305 - 350	FQLFQSPHGKDLLFKDSADGFLKIPSKMDFELYLGYEYVTALQNLK				
H20	320 - 327	DSADGFLK	50.7			
HCL	320 - 327	DSADGFLK	49.7			
	351 - 412	ESKPPDSSKDECMVKWCAIGHQERTKCDRWSGFGSGGAIECETAENTEETECIAKIMKGEADAMS				
HCL	351 - 365	ESKPPDSSKDECMVK	110.2			C-362

Fortsetzung auf nächster Seite

## 7 Pepview-Ergebnisse Dionex Mix unbehandelt - behandelt mit HCl

Fortgesetzt von letzter Seite

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln→pyro-Glu (N-term)	Oxidation (W)	Carboxymethyl (C)
H2O	351 - 365	ESKPPDSSKDECMVK	106.5			C-362
H2O	351 - 365	ESKPPDSSKDECMVK	83.3			C-362
HCL	351 - 365	ESKPPDSSKDECMVK	82.1			C-362
H2O	351 - 365	ESKPPDSSKDECMVK	81.9			C-362
HCL	351 - 365	ESKPPDSSKDECMVK	48.1			C-362
H2O	366 - 374	WCAIGHQER	45.2			C-367
H2O	366 - 374	WCAIGHQER	38.7			C-367
HCL	384 - 402	SGGAIECETAENTEECIAK	22.6			C-390 C-399
	412 - 456	SLDGGYLYIAGKGLVPVLAENYKTEGESCKNTPKGYLAVAVVK				
HCL	412 - 423	SLDGGYLYIAGK	72.8			
HCL	416 - 423	GYLYIAGK	30.3			
HCL	417 - 423	YLYIAGK	27.1			
H2O	424 - 435	CGLVPVLAENYK	56.2			C-424
HCL	424 - 435	CGLVPVLAENYK	56.2			C-424
HCL	424 - 435	CGLVPVLAENYK	42.1			C-424
H2O	424 - 435	CGLVPVLAENYK	29.7			C-424
HCL	426 - 435	LVPVLAENYK	61.7			
HCL	448 - 456	GYLAVAVVK	42.5			
H2O	448 - 456	GYLAVAVVK	40.5			
	457 - 513	TSDANINWNNLKDKKSCHTAVDRTAGWNIPMGLLYSKINNCKFDEFFSAGCAPGSPR				
H2O	457 - 470	TSDANINWNNLKDK	44.8			
H2O	457 - 468	TSDANINWNNLK	76.9			
H2O	457 - 468	TSDANINWNNLK	21.6			
H2O	480 - 493	TAGWNIPMGLLYSK	31.9			
H2O	499 - 513	FDEFFSAGCAPGSPR	79.8			C-507
HCL	499 - 513	FDEFFSAGCAPGSPR	78.4			C-507
H2O	499 - 513	FDEFFSAGCAPGSPR	42.2			C-507
HCL	499 - 513	FDEFFSAGCAPGSPR	28.1			C-507
	514 - 560	NSSLCALCIGSEKGTGKECPVNSNERYGYTGAFRCLVEKGDVAFVK				
HCL	514 - 526	NSSLCALCIGSEK	36.6			C-518 C-521
HCL	516 - 526	SLCALCIGSEK	41.2			C-518 C-521
HCL	540 - 548	YYGYTGAFR	57.5			
H2O	540 - 548	YYGYTGAFR	56.2			
	553 - 607	KGDVAFVKDQTVIQNTDGNNNEAWAKNLKENFEVLCKDGTGRKPVTD AENCHLAR				
HCL	553 - 560	KGDVAFVK	31			
HCL	554 - 562	GDVAFVKDQ	21.5			
H2O	554 - 560	GDVAFVK	42.4			
HCL	554 - 560	GDVAFVK	33.8			
H2O	561 - 578	DQTVIQNTDGNNNEAWAK	140.5			
H2O	561 - 578	DQTVIQNTDGNNNEAWAK	116.3			
H2O	561 - 578	DQTVIQNTDGNNNEAWAK	44.4			
H2O	561 - 578	DQTVIQNTDGNNNEAWAK	37.5			
HCL	582 - 590	KENFEVLCK	56.3			C-589
H2O	582 - 590	KENFEVLCK	55.9			C-589
H2O	583 - 594	ENFEVLCKDGTR	24.3			C-589
H2O	583 - 590	ENFEVLCK	36.1			C-589
HCL	583 - 590	ENFEVLCK	34.6			C-589
HCL	585 - 590	FEVLCK	31.3			C-589
H2O	595 - 607	KPVTDAENCHLAR	82.7			C-603
H2O	595 - 607	KPVTDAENCHLAR	78.8			C-603
H2O	595 - 607	KPVTDAENCHLAR	74			C-603
HCL	595 - 607	KPVTDAENCHLAR	67.9			C-603
HCL	595 - 607	KPVTDAENCHLAR	64.9			C-603
HCL	595 - 607	KPVTDAENCHLAR	52.7			C-603
HCL	595 - 607	KPVTDAENCHLAR	39.7			C-603
H2O	599 - 607	DAENCHLAR	36.3			C-603
HCL	599 - 607	DAENCHLAR	32.9			C-603
H2O	600 - 607	AENCHLAR	41.1			C-603
	601 - 653	ENCHLARGPNHAVVSRKDKATCVEKILNKQDDFGKSVTDCTSNFCLFQSNK				
HCL	602 - 607	NCHLAR	26.5			C-603
H2O	602 - 607	NCHLAR	20			C-603

Fortsetzung auf nächster Seite

# Anhang

Fortgesetzt von letzter Seite

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln->pyro-Glu (N-term)	Oxidation (M)	Carboxymethyl (C)
H2O	637 - 653	SVTDCTSNFCLFQSNK	38.2			C-641 C-646
H2O	637 - 653	SVTDCTSNFCLFQSNK	38.1			C-641 C-646
	652 - 704	SKDLLFRDDTKCLASIAKKTYSYLGDDYVRAMTNLRQCSTSKLLEACTFHKP				
HCL	652 - 658	SKDLLFR	47.2			
H2O	652 - 658	SKDLLFR	44.9			
H2O	654 - 662	DLLFRDDTK	26			
H2O	654 - 658	DLLFR	29.3			
HCL	654 - 658	DLLFR	23.2			
HCL	663 - 669	CLASIAK	44.7			C-663
H2O	663 - 669	CLASIAK	41.7			C-663
H2O	670 - 682	KTYDSYLGDDYVR	99.3			
HCL	670 - 682	KTYDSYLGDDYVR	99.2			
HCL	670 - 682	KTYDSYLGDDYVR	61			
H2O	670 - 682	KTYDSYLGDDYVR	49.8			
HCL	670 - 682	KTYDSYLGDDYVR	24.5			
H2O	671 - 682	TYDSYLGDDYVR	63.2			
HCL	671 - 682	TYDSYLGDDYVR	60.8			
HCL	671 - 682	TYDSYLGDDYVR	52.8			
HCL	671 - 682	TYDSYLGDDYVR	33.4			
H2O	671 - 682	TYDSYLGDDYVR	24.7			
HCL	674 - 682	SYLGDDYVR	50.3			
H2O	695 - 704	LLEACTFHKP	53.7			C-699
HCL	695 - 704	LLEACTFHKP	42.8			C-699
H2O	695 - 704	LLEACTFHKP	39.3			C-699
HCL	695 - 704	LLEACTFHKP	35.8			C-699
HCL	697 - 704	EACTFHKP	20.9			C-699

Tabelle 9 – Alcohol dehydrogenase (Hefe) unbehandelt - behandelt HCl 5 h 30 min 15 °C

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln->pyro-Glu (N-term)	Oxidation (M)	Carboxymethyl (C)
	1 - 50	MSIPETQKGVIYFYESHGKLEHKDIPVPPKANELLINVKYSGVCHTDLHA				
H2O	9 - 18	GVIFYESHGK	53.8			
HCL	9 - 18	GVIFYESHGK	41.8			
HCL	9 - 18	GVIFYESHGK	38.3			
H2O	9 - 18	GVIFYESHGK	36.6			
HCL	9 - 16	GVIFYESH	33.1			
H2O	11 - 18	IFYESHGK	39.3			
HCL	11 - 18	IFYESHGK	38.5			
HCL	12 - 18	FYESHGK	31.9			
H2O	12 - 18	FYESHGK	30.6			
HCL	23 - 30	DIPVPKPK	38.2			
HCL	23 - 28	DIPVPK	20.4			
H2O	23 - 28	DIPVPK	20.2			
H2O	25 - 30	PVPKPK	22.9			
HCL	25 - 30	PVPKPK	21.5			
HCL	31 - 39	ANELLINVK	57.5			
H2O	31 - 39	ANELLINVK	47			
	51 - 100	WHGDWPLPVKPLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNCSMA				

Fortsetzung auf nächster Seite



## 7 Pepview-Ergebnisse Dionex Mix unbehandelt - behandelt mit HCl

Fortgesetzt von letzter Seite

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln→pyro-Gln (N-termQ)	Oxidation (M)	Carboxymethyl (C)
HCL	61 - 70	LPLVGGHEGA	22.7			
H2O	64 - 81	VGGHEGAGVVVGMGENVK	26			
HCL	70 - 81	AGVVVGMGENVK	27.3			
H2O	75 - 87	GMGENVKGWKIGD	25.9			
HCL	85 - 92	IGDYAGIK	55.1			
H2O	85 - 92	IGDYAGIK	51.9			
101 - 162 CEYCELGNESNCPHADLSGYTHDGSFQQYATADAVQAAHIPQGTDLAQVAPILCAGITVYKA						
	155 - 212	AGITVYKALKSANLMAGHWWAISGAAGLGSLAVQYAKAMGYRVLGIDGEGKEELFR				
HCL	185 - 192	SLAVQYAK	26.6			
HCL	198 - 212	VLGIDGEGKEELFR	123.9			
H2O	198 - 212	VLGIDGEGKEELFR	123.5			
H2O	198 - 212	VLGIDGEGKEELFR	114			
HCL	198 - 212	VLGIDGEGKEELFR	107.1			
H2O	198 - 207	VLGIDGEGEK	73.1			
HCL	198 - 207	VLGIDGEGEK	65.8			
HCL	200 - 212	GIDGEGKEELFR	23.8			
H2O	200 - 212	GIDGEGKEELFR	23.1			
206 - 250 GKEELFRSIGGEVFIDFTKEKDIVGAVLKATDGGAGHGVINVSVE						
HCL	225 - 234	EKDIVGAVLK	72.7			
H2O	225 - 234	EKDIVGAVLK	60.1			
H2O	225 - 234	EKDIVGAVLK	34.3			
HCL	225 - 234	EKDIVGAVLK	23			
HCL	227 - 234	DIVGAVLK	37.3			
H2O	227 - 234	DIVGAVLK	27.3			
251 - 309 AAIEASTRYVRANGTTVLVGMPAGAKCCSDVFNQVVKSSISIVGSYVGNRADTREALDFF						
H2O	262 - 276	ANGTTVLVGMPAGAK	93.1			
HCL	262 - 276	ANGTTVLVGMPAGAK	71.9			
H2O	262 - 276	ANGTTVLVGMPAGAK	63.8			
HCL	262 - 276	ANGTTVLVGMPAGAK	63.4			
HCL	262 - 276	ANGTTVLVGMPAGAK	31.5			
H2O	262 - 276	ANGTTVLVGMPAGAK	26			
H2O	262 - 276	ANGTTVLVGMPAGAK	24.7	M-271		
HCL	262 - 276	ANGTTVLVGMPAGAK	22.5			
H2O	262 - 276	ANGTTVLVGMPAGAK	22.4			
H2O	264 - 276	GTTVLVGMPAGAK	36.1			
HCL	265 - 276	TTVLVGMPAGAK	39.8			
HCL	266 - 276	TVLVGMPAGAK	32.7			
H2O	277 - 287	CCSDVFNQVVK	71.3			C-277 C-278
HCL	277 - 287	CCSDVFNQVVK	67.9			C-277 C-278
H2O	277 - 287	CCSDVFNQVVK	25.9			C-277 C-278
HCL	279 - 287	SDVFNQVVK	45.4			
HCL	288 - 299	SISIVGSYVGNR	65			
H2O	288 - 299	SISIVGSYVGNR	63.5			
H2O	288 - 299	SISIVGSYVGNR	32.2			
HCL	288 - 299	SISIVGSYVGNR	29.2			
HCL	288 - 299	SISIVGSYVGNR	27.3			
304 - 348 EALDFFARGLVKSPIKVVGLSTLPEIYEKMEKGQIVGRYVVDTSK						
H2O	304 - 311	EALDFFAR	49.9			
HCL	304 - 311	EALDFFAR	43.7			
HCL	320 - 332	VVGLSTLPEIYEK	72.2			
H2O	320 - 332	VVGLSTLPEIYEK	68.4			
HCL	320 - 332	VVGLSTLPEIYEK	21.9			
HCL	324 - 332	STLPEIYEK	43.2			
H2O	324 - 332	STLPEIYEK	37.9			
HCL	325 - 332	TLPEIYEK	24			

Tabelle 10 –  $\beta$ -Galactosidase (E.Coli) unbehandelt - behandelt HCl 5 h 30 min 15 °C

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln→pyro-Glu (N-termQ)	Oxidation (N)	Carboxymethyl (C)
	1 - 50	MTMITDSLAVVLQRRDWNPGVTQLNRLAAHPPFASWRNSEEARTDRPSQ				
H2O	15 - 27	RDWENPGVTQLNR	43.8			
H2O	16 - 27	DWENPGVTQLNR	61.5			
H2O	16 - 27	DWENPGVTQLNR	27.2			
H2O	28 - 38	LAAHPPFASWR	60.2			
	51 - 100	QLRSLNGEWRFAWFPAPAEVPESWLECDLPEADTVVVP SNWQM HGYDAPI				
	101 - 150	YTNVTPITVNPFPVPTENPTGCYSLTFNVDES WLQEGQTRI IFDGVNSA				
	151 - 200	FHLWCNGRWVG YGQDSRLPSEFDLSAFLRAGENRLAMVLRWSDGSYLE				
H2O	159 - 167	WVG YGQDSR	36.9			
HCL	185 - 191	LAVMVL R	51			
H2O	185 - 191	LAVMVL R	21.4			
	201 - 250	QDMWRMSGIFRDVSL LHKPTTQISDFHVATRFNDDFSRAVLEAEVQMCGE				
HCL	206 - 211	MSGIF R	40.1			
H2O	206 - 211	MSGIF R	37.8			
H2O	212 - 231	DVSL LHKPTTQISDFHVATR	43			
H2O	212 - 231	DVSL LHKPTTQISDFHVATR	21.6			
HCL	232 - 238	FNDDFS R	60.7			
H2O	232 - 238	FNDDFS R	41.8			
	251 - 300	LRDYL RVTSLWQGETQVASGTPFGGEI IDERGGYADRVTLR LNVENPK				
	301 - 353	LWSAEIPNL YRAVVELHTADGTLIEAEACDVGFREVRIENGL LLLNGKPLLIR				
	354 - 400	GVNRHEHHLHGQVMDEQTMVQDILLMKQNNFNAVRC SHYPNHLWY				
	401 - 450	TLCDRYGL YVDEANIETHGMVPMNRLTDDPRWLPAMSERVTRMVQRDRN				
H2O	433 - 440	WLPAMSER	23.1			
	451 - 504	HPSV I IWSLGNESGHGANHDALYRWIKSVDP SRPVQYEGGGADTTATDIICPMY				
	505 - 552	ARVDEDQPPFAVPKWSIKKWLSPGETRPLILCEYAHAMGNSLG GFAK				
H2O	507 - 518	VDEDQPPFAVPK	77.3			
HCL	507 - 518	VDEDQPPFAVPK	67.1			
H2O	524 - 532	WLSLPGETR	28.4			
HCL	542 - 552	AMGNSLG GFAK	37.8			
H2O	542 - 552	AMGNSLG GFAK	20.5			
	553 - 600	YWQAFRQY PRLQGGFVWDVVDQSLIKYDENGNPWSAYGGDFGDTPNDR				
H2O	553 - 558	YWQAFR	23.9			
	601 - 650	QFCMNGLVFADRTPHALTEAKHQQFFQFRLSGQTIEVTSEYLF RHSDN				
H2O	613 - 622	TPHPALTEAK	22.2			
HCL	623 - 631	HQQFFQFR	56			
H2O	623 - 631	HQQFFQFR	51.4			
H2O	623 - 631	HQQFFQFR	28.5			
	651 - 701	ELLHWMVALDGKPLASGEVPLDVAPQKGQLIELPELPQPESAGQLWLTVRV				
	702 - 750	VQPNATAWSEAGHISAWQQWRLAENLSVTLPAAASHAIPHLTTSEMDFCI				
	751 - 801	ELGNKRWQFNRSQGLSQMWIGKKQLLTPLRDQFTRAPLDNDIGVSEATR				
H2O	762 - 775	QSGFLSQMWIGDKK	60.3			
H2O	776 - 782	QLLTPLR	36.9			

Fortsetzung auf nächster Seite

## 7 Pepview-Ergebnisse Dionex Mix unbehandelt - behandelt mit HCl

Fortgesetzt von letzter Seite

				Modifikationen		
Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Gln→pyro-Glu (N-termQ)	Oxidation (M)	Carboxymethyl (C)
H2O	776 – 782	QLLTPLR	35.8	Q-776		
HCL	776 – 782	QLLTPLR	21			
H2O	788 – 801	APLDNDIGVSEATR	95.4			
HCL	788 – 801	APLDNDIGVSEATR	85.4			
HCL	788 – 801	APLDNDIGVSEATR	40.2			
H2O	788 – 801	APLDNDIGVSEATR	37.5			
H2O	788 – 801	APLDNDIGVSEATR	25.1			
H2O	802 – 854 802 – 810	IDPNAWVERWKAAGHYQAEAAALLQCTADTLADAVLITTAHAWQHKGKTLFISR IDPNAWVER	56.8			
H2O	855 – 900	KTYRIDSGGQMAITVDVEVASDTPHPARIGLNCQLAQVAERVNWLG	100.5			
H2O	883 – 895	IGLNCQLAQVAER				C-887
HCL	883 – 895	IGLNCQLAQVAER				C-887
H2O	883 – 895	IGLNCQLAQVAER				C-887
HCL	883 – 895	IGLNCQLAQVAER		28.9		C-887
HCL	901 – 953 911 – 918	LGPQENYPDRLTAACFDRWDLPLSDMYTPYVFPSENGRCGTRELNYPGHQWR LTAACFDR	42.8			C-915
H2O	911 – 918	LTAACFDR	42.8			C-915
H2O	944 – 953		61.4	ELNYGPHQWR		
H2O	944 – 953		52.5	ELNYGPHQWR		
H2O	954 – 1000 954 – 962	GDFQFNISRYSQQQLMETSHRLLHAEEGTWLNIDGFHMGIGDDSW GDFQFNISR	58.8			
HCL	954 – 962	GDFQFNISR	33.6			
H2O	963 – 974	YSQQQLMETSHR	57.6			
H2O	963 – 974	YSQQQLMETSHR	52.2			
HCL	963 – 974	YSQQQLMETSHR	43.1			
HCL	963 – 974	YSQQQLMETSHR	39.8			
H2O	1001 – 1024 1015 – 1024	SPSVSAEFQLSAGRYHYQLVWCQK YHYQLVWCQK	24			C-1022

Tabelle 11 – Cytochrome C (Rind) unbehandelt - behandelt HCl 5h30min 5 h 30 min 15 °C

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln->pyro-Gln (N-termQ)	Oxidation (M)	Carboxymethyl (C)
	1 - 54	MGDVEKGKKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKGTGPNLHGLFGRKTGQAPGFSYTDANK	85.5			
HCL	29 - 39	TGPNLHGLFGR				
H2O	29 - 39	TGPNLHGLFGR	71.3			
H2O	29 - 39	TGPNLHGLFGR	61.8			
HCL	29 - 39	TGPNLHGLFGR	61.6			
HCL	29 - 37	TGPNLHGLF	28.5			
H2O	29 - 37	TGPNLHGLF	28.5			
H2O	30 - 39	GNLHGLFGR	30.9			
HCL	30 - 39	GNLHGLFGR	21.3			
H2O	31 - 39	PNLHGLFGR	35.3			
HCL	31 - 39	PNLHGLFGR	20			

Fortsetzung auf nächster Seite

# Anhang

Fortgesetzt von letzter Seite

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln->pyro-Glu (N-termQ)	Oxidation (N)	Carboxymethyl (C)
H20	40 - 54	KTGQAPGFSYTDANK	129.3			
H20	40 - 54	KTGQAPGFSYTDANK	94.5			
HCL	40 - 54	KTGQAPGFSYTDANK	65.7			
HCL	40 - 54	KTGQAPGFSYTDANK	65.6			
HCL	40 - 54	KTGQAPGFSYTDANK	41.7			
H20	41 - 54	TGQAPGFSYTDANK	63			
HCL	41 - 54	TGQAPGFSYTDANK	58.9			
HCL	41 - 54	TGQAPGFSYTDANK	51.5			
H20	41 - 54	TGQAPGFSYTDANK	44.8			
HCL	41 - 54	TGQAPGFSYTDANK	27.2			
HCL	41 - 54	TGQAPGFSYTDANK	21			
HCL	43 - 54	QAPGFSYTDANK	40			
	55 - 101	NGGITWGEETLMEYLENPKKYIPGTMIFAGIKKKGEREDLIAYLKK				
HCL	64 - 73	TLMEYLENPK	22.6			
HCL	81 - 87	MIFAGIK	32			
H20	81 - 87	MIFAGIK	30			
HCL	89 - 100	KGEREDLIAYLK	39.3			
H20	89 - 100	KGEREDLIAYLK	37			
HCL	89 - 100	KGEREDLIAYLK	24.7			
H20	90 - 100	GEREDLIAYLK	26.5			
HCL	93 - 100	EDLIAYLK	60.2			
H20	93 - 100	EDLIAYLK	60			
102 - 105 ATNE						

Tabelle 12 – Lysozyme C (Huhn) unbehandelt - behandelt HCl 5 h 30 min 15 °C

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen		
				Gln->pyro-Glu (N-termQ)	Oxidation (N)	Carboxymethyl (C)
	1 - 51	MRSLLILVLCFLPLAALGKVFGRCELAAMKRRHGLDNYRGYSLGNWVCAAK				
H20	15 - 31	AALGKVFGRCELAAMK	28.6			C-24
HCL	24 - 32	CELAAMKR	21			C-24
HCL	24 - 31	CELAAMK	40.6			C-24
H20	24 - 31	CELAAMK	38			C-24
H20	40 - 51	GYSLGNWVCAAK	69.1			C-48
	52 - 100	FESNFNTQATNRNTDGYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSA				
H20	52 - 63	FESNFNTQATNR	99.3			
HCL	52 - 63	FESNFNTQATNR	70.8			
HCL	52 - 63	FESNFNTQATNR	58.5			
H20	52 - 63	FESNFNTQATNR	38.8			
H20	52 - 63	FESNFNTQATNR	34.7			
HCL	52 - 63	FESNFNTQATNR	34.6			
H20	64 - 79	NTDGYGILQINSR	158.5			
HCL	64 - 79	NTDGYGILQINSR	122.7			
H20	64 - 79	NTDGYGILQINSR	51.8			
HCL	64 - 79	NTDGYGILQINSR	51.6			
H20	64 - 79	NTDGYGILQINSR	45.1			

Fortsetzung auf nächster Seite

## 7 Pepview-Ergebnisse Dionex Mix unbehandelt - behandelt mit HCl

Fortgesetzt von letzter Seite

Probe	Position	Proteinsequenz	Score	Modifikationen	
				Gln->pyro-Glu(N-term)	Carboxymethyl (C)
HCL	64 - 79	NTDGSTDYGILQINSR	33.4		
HCL	64 - 79	NTDGSTDYGILQINSR	20.9		
HCL	68 - 79	STDYGILQINSR	55		
HCL	69 - 79	TDYGILQINSR	64		
HCL	72 - 79	GILQINSR	24.3		
	101 - 147	LLSSDITASVNC AKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCRL			
H2O	133 - 143	CKGTDVQAWIR	95.5		C-133
H2O	133 - 143	CKGTDVQAWIR	36.1		C-133
H2O	135 - 143	GTDVQAWIR	49.4		

## 8 Mascot-Scoring des Dionex Mix beim $^{18}\text{O}$ -Labeling

**Tabelle 13** – Mascot-Scoring des Dionex Mix beim  $^{18}\text{O}$ -Labeling mit und ohne Satellitenpeak-Definitionen

Proteine	- Satellite Matches	Score	+ Satellite Matches	Score	Peptid
TRFE_BOVIN	36	934	37	953	
		28		30	K.DLLFK_D + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		31		31	K.LNELR.G
		29		(29)	K.DLLFR.D
		(27)		30	K.DLLFR_D + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		34		34	K.GDVAIVK.D
				(21)	K.GDVAIVK_D + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		44		44	K.DSADGFLK.I
		(30)		(30)	K.DSADGFLK_I + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		21		28	K.GYLAVAVK_T + Label:180(2) (C-term)
		21		30	R.GPNHAVVSR_K + Label:180(2) (C-term)
		46		46	R.YGYTGAFR.C
		(29)		(37)	R.YGYTGAFR_C + Label:180(2) (C-term)
		(67)		(67)	K.ELPDPQESIQR.A
		(46)		(46)	K.ELPDPQESIQR.A
		(43)		(43)	K.ELPDPQESIQR_A + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		78		78	K.ELPDPQESIQR_A + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		79		79	K.TYDSYLGDDYVR.A
		(60)		(60)	K.TYDSYLGDDYVR_A + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		27		27	K.KTYDSYLGDDYVR.A
		113		113	K.DNPQTHYAVAVVK.K
		(67)		(67)	K.DNPQTHYAVAVVK.K
		(35)		(36)	K.DNPQTHYAVAVVK_K + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		94		94	K.HSTVFDNLNPNEDR.K
		(44)		(44)	K.HSTVFDNLNPNEDR.K
		(59)		(59)	K.HSTVFDNLNPNEDR_K + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		(34)		(35)	K.HSTVFDNLNPNEDR_K + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		(75)		(75)	K.DKPDNFQLFQSPHGK.D
		(68)		(68)	K.DKPDNFQLFQSPHGK.D
		(41)		(41)	K.HSTVFDNLNPNEDRK.N
		57		57	K.HSTVFDNLNPNEDRK.N
		(46)		(50)	K.DKPDNFQLFQSPHGK_D + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		104		104	K.DKPDNFQLFQSPHGK_D + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		(37)		(37)	K.HSTVFDNLNPNEDRK_N + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		130		130	K.GEADAMSLDGGVLYIAGK.C
		(54)		(54)	K.GEADAMSLDGGVLYIAGK.C
		(106)		(106)	K.GEADAMSLDGGVLYIAGK_C + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		(70)		(70)	K.GEADAMSLDGGVLYIAGK_C + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
ALBU_BOVIN	40	792	40	795	
		42		42	K.LVTDLT.K.V
		(38)		(38)	K.LVTDLT.K_V + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		(37)		(37)	K.AEFVEVTK.L
		39		39	K.YLYEIAR.R
		37		37	K.AEFVEVTK_L + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		(28)		(29)	K.YLYEIAR_R + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		(22)		(22)	K.DLGEHF.K.G
		29		29	K.DLGEHF.K.G
		(24)		(26)	K.DLGEHF.K_G + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		(23)		(27)	K.DLGEHF.K_G + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		(62)		(62)	K_QTALVELLK_H + Gln->pyro-Glu (N-term Q)
		(47)		(47)	K_QTALVELLK_H + Gln->pyro-Glu (N-term Q); Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		64		64	K.QTALVELLK.H
		(53)		(53)	K.QTALVELLK_H + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		(29)		(29)	K.KQTALVELLK.H
		57		57	K.KQTALVELLK.H
		(21)		(24)	K.KQTALVELLK_H + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		(47)		(47)	K.KQTALVELLK_H + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		65		65	K.LVNELTEFAK.T
		(60)		(60)	K.LVNELTEFAK_T + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		57		57	R.FKDLGEEHF.K.G
		(55)		(55)	R.FKDLGEEHF.K.G
		(53)		(53)	R.FKDLGEEHF.K_G + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		(47)		(47)	R.FKDLGEEHF.K_G + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		(58)		(58)	K.HLVDEPQNLIK.Q
		(68)		(68)	K.HLVDEPQNLIK.Q
		(63)		(63)	K.HLVDEPQNLIK_Q + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		80		80	K.HLVDEPQNLIK_Q + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)

Fortsetzung auf nächster Seite

# 8 Mascot-Scoring des Dionex Mix beim <sup>18</sup>O-Labeling

Fortgesetzt von letzter Seite

Proteine	- Satellite Matches	Score	+ Satellite Matches	Score	Peptid
		(70)	(70)		K.TVMENFVAFVDK.C
		82	82		K.TVMENFVAFVDK.C + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		(74)	(74)		K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation (M)
		(57)	(57)		K.TVMENFVAFVDK.C + Oxidation (M); Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		100	(100)		K.LGEYGFQNALIVR.Y
		(96)	103		K.LGEYGFQNALIVR.Y + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		(66)	(66)		R.KVPQVSTPTLVEVSR.S
		97	97		R.KVPQVSTPTLVEVSR.S
		(44)	(47)		R.KVPQVSTPTLVEVSR.S + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		(43)	(43)		R.KVPQVSTPTLVEVSR.S + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		(29)	(29)		K.DAIPENLPPLTADFAEDK.D
		41	41		K.DAIPENLPPLTADFAEDK.D
ADHi_YEAST	23	649	25	679	
		27	27		K.DIVGAVLK.A
			(22)		K.DIVGAVLK.A + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		53	53		K.IGDYAGIK.W
		(39)	(44)		K.IGDYAGIK.W + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
			20		K.DIPVPKPK.A + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		66	66		R.VLGIDGGEGK.E
		(53)	(53)		R.VLGIDGGEGK.E + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		43	43		R.EALDFFAR.G
		(30)	(33)		R.EALDFFAR.G + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		53	53		K.ANELLINVK.Y
		(48)	(51)		K.ANELLINVK.Y + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		37	37		K.EKDIVGAVLK.A
		(27)	(27)		K.EKDIVGAVLK.A
		(36)	(36)		K.EKDIVGAVLK.A + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		(26)	(26)		K.EKDIVGAVLK.A + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		(49)	(49)		K.GVIFYESHGK.L
		(27)	(27)		K.GVIFYESHGK.L
		53	53		K.GVIFYESHGK.L + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		50	59		K.SISIVGSYVGNR.A + Label:180(2) (C-term)
		63	63		R.ANGTTVLVGMPAGAK.C
		76	76		K.VVGLSTLPEIYEK.M
		(66)	(69)		K.VVGLSTLPEIYEK.M + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		(62)	(62)		R.VLGIDGGEGKEELFR.S
		129	129		R.VLGIDGGEGKEELFR.S
		(103)	(103)		R.VLGIDGGEGKEELFR.S + Label:180(2) (C-term); 4 Label:180(2) (DE)
CYC_BOVIN	15	344	17	392	
			22		K.IFVQK.C + Label:180(2) (C-term)
			22		K.MIFAGIK.K + Label:180(2) (C-term)
		30	30		K.KYIPGK.M
		(55)	(55)		R.EDLIAYLK.K
		55	55		R.EDLIAYLK.K + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)
		(27)	(27)		K.TGPNLHGLFGR.K
		(20)	(28)		K.TGPNLHGLFGR.K + Label:180(2) (C-term)
		60	65		K.TGPNLHGLFGR.K + Label:180(2) (C-term)
		26	26		K.GEREDLIAYLK.K + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		(24)	(24)		K.KGEREDLIAYLK.K
		26	26		K.KGEREDLIAYLK.K
		(21)	(21)		K.KGEREDLIAYLK.K + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		(34)	(34)		K.TGQAPGFSYTDANK.N
		72	72		K.TGQAPGFSYTDANK.N
		(62)	(62)		K.TGQAPGFSYTDANK.N + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		75	75		R.KTGQAPGFSYTDANK.N
		(50)	(58)		R.KTGQAPGFSYTDANK.N + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
BGAL_ECOLI	10	304	12	325	
			22		K.TLFISR.K + Label:180(2) (C-term)
		32	32		R.LAVMVLRL.W + Label:180(2) (C-term)
		35	35		K.QLLTPLR.D
		41	41		R.TPHPALTEAK.H
		(40)	(40)		R.TPHPALTEAK.H
			(21)		R.TPHPALTEAK.H + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		55	55		R.VDEDQPFPAVPK.W
		(46)	(46)		R.VDEDQPFPAVPK.W + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		101	101		R.APLDNDIGVSEATR.I
		(52)	(55)		R.APLDNDIGVSEATR.I + Label:180(2) (C-term); 3 Label:180(2) (DE)
		(39)	(39)		R.YSQQLMETSHR.H
		39	39		R.YSQQLMETSHR.H + Oxidation (M)
LYSC_CHICK	8	297	8	297	
		42	42		R.HGLDNYR.G

Fortsetzung auf nächster Seite

## Anhang

Fortgesetzt von letzter Seite					
Proteine	- Satellite		+ Satellite		Peptid
	Matches	Score	Matches	Score	
		(34)	(40)		R.HGLDNYR_G + Label:180(2) (C-term); Label:180(2) (DE)
		25	25		K.RHGLDNYR.G
		80	80		K.FESNFNTQATNR.N
		(40)	(40)		K.FESNFNTQATNR.N
		149	149		R.NTDGSTDYGILQINSR.W
		(37)	(37)		R.NTDGSTDYGILQINSR.W
		(118)	(118)		R.NTDGSTDYGILQINSR_W + Label:180(2) (C-term); 2 Label:180(2) (DE)

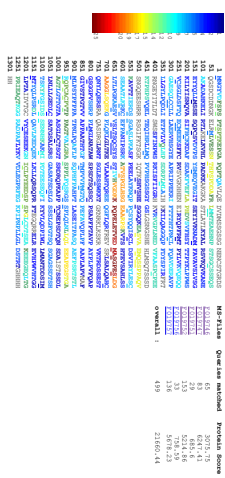


## **9 Pepview Ausgabe**

**Abbildung 19** – Pevview Software: Ansicht der ersten Seite

[illegible]

**Protein View:**



### Peptide Summary :

[illegible]

[illegible]



# Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
ACN	Acetonitril
Å	Ångström
AQUA	Absolute Quantiation
AUC	Area under curve
Asp-N	Endoproteinase Asp-N
$\beta$ -BTRC1	F-box/WD repeat-containing protein 1A
$\beta$ -TRCP2	F-box/WD repeat-containing Protein 11
Bis-Tris	2-[Bis(2-Hydroxyethyl)amino]-2-(Hydroxymethyl)-1,3-Propanediol
BPC	Base Peak Chromatogramm
Brij 35	Polyoxyethylen-(23)-laurylether
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
°C	Grad Celsius
CA	Citric Acid - Zitronensäure
ca.	circa
CAD	Collision activated dissociation
CI	chemische Ionisierung
CID	Collision induced dissociation
CKI $\alpha$	Casein kinase I isoform alpha
CKI $\delta$	Casein kinase I isoform delta
CKI $\epsilon$	Casein kinase I isoform epsilon
CK2	Casein Kinase 2
CRY1	Cryptochrome-1
CRY2	Cryptochrome-2
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EIC	Extracted Ion Chromatogramm
ESI	Electrospray ionisation
ETD	Electron Transfer Dissociation
F	Phenylalanin
FA	Ameisensäure (Formic Acid)

## **Abkürzungsverzeichnis**

FTICR	Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz
G	Glycin
Glu-C	Endoproteinase Glu-C
GSK3	Glycogen Synthase Kinase-3
H	Histidin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Isoleucin
IAA	Iodacetamid
ICAT	Isotope-Coded Affinity Tag
ICPL	Isotope-Coded Protein Labels
ICP-MS	Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometry
IGEPAL CA-630	Octylphenoxypolyethoxyethanol
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
iTRAQ	Isobaric tags for absolute quantiation
K	Lysin
L	Leucin
LC	Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry
LDS	Lithiumdodecylsulfat
Lys-C	Endoproteinase Lys-C
M	Methionin
M	Molar
m	milli
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MeCAT	Metal-coded affinity tags
MOAC	Metal oxide affinity chromatography
MOPS	3-(N-morpholino)Propansulfonsäure
mPER1	Period circadian protein homolog 1 (Mammalian)
mPER2	Period circadian protein homolog 2 (Mammalian)
MRM	Multiple reaction monitoring
μ	mikro
N	Asparagin
n	nano
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
P	Prolin
p	pico
Pa	Pascal
PAC	Phosphoramidate chemistry
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEEK	Polyetheretherketon

PKA	cAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Alpha
PTM	Posttranslationale Modifikation
Q	Glutamin
3Q	Triple Quadrupole
Q-TOF	Quadrupole Time of Flight
R	Arginin
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture
SIMAC	Sequential Elution from IMAC
SLD	Soft Laser Desorption
SRM	Single Reaction Monitoring
T	Threonin
TEA	Triethylamin
TMT	Tandem Mass Tag
TOF	Time of Flight
TRFE	Serotransferrin
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-Diol
V	Valin
vgl.	vergleiche
W	Tryptophan
Y	Tyrosin





# Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau eines ETD 3D-Ionenfallen-Massenspektrometers . . .	3
1.2	Schematischer Aufbau eines Q-TOF Massenspektrometers . . . . .	4
1.3	Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers . . . .	5
1.4	Ablauf der Proteinanalyse mittels LC-MS/MS . . . . .	7
1.5	Bestimmung des Ladungszustandes aus dem MS1-Spektrum . . . . .	8
1.6	Nomenklatur für Peptidfragmente nach Biemann (1990) . . . . .	8
1.7	Sequenzinformation im MS <sup>2</sup> -Spektrum . . . . .	9
1.8	Prozessierung der Massenspektrometrie Rohdaten Teil 1 . . . . .	10
1.9	Prozessierung der Massenspektrometrie Rohdaten Teil 2 . . . . .	11
1.10	Arbeitsabläufe verschiedener Quantifizierungsmethoden mittels Massenspektrometrie . . . . .	12
1.11	SILAC-Labeling nach (Ong et al., 2003), <sup>13</sup> C-Kohlenstoff in der gelabelten Variante von Arginin und Lysin . . . . .	15
1.12	<sup>15</sup> N-Labeling, <sup>15</sup> N-Stickstoff in der gelabelten Variante des Peptids . . . .	15
1.13	Ansatzpunkte verschiedener Methoden des chemischen Labelings mit stabilen Isotopen . . . . .	16
1.14	Aufbau des ICAT-Massentags . . . . .	17
1.15	Aufbau des ICPL-Massentags . . . . .	17
1.16	Aufbau des iTRAQ-Massentags (4-plex) . . . . .	18
1.17	Aufbau des MeCAT-Massentags . . . . .	23
1.18	Schematischer Aufbau der circadianen Uhr bei Säugetieren nach Gallego und Virshup (2007) (modifiziert) . . . . .	25
1.19	Bekannte Bindungsregionen und Domänen von mPER2 . . . . .	27
3.1	Elutionsprofil der Nanopumpe bei 50 minütiger Standardmessung . . . . .	35
3.2	Aufbau des Agilent HPLC-Chip-Systems . . . . .	36
3.3	Einstellung der Kollisionsenergie am Q-TOF abhängig von Ladung und Masse	37
3.4	Arbeitsablauf für die „Bottom-Up“-Proteinanalyse mittels In-Gel-Verdau und LC-MS/MS-Analyse . . . . .	38
3.5	Aufbau des Dionex Ultimate 3000 Systems zur Phosphopeptid-Anreicherung mit TiO <sub>2</sub> . . . . .	40
3.6	Arbeitsablauf für die Phosphoproteinanalyse mittels In-Gel-Verdau, Phosphopeptid-Anreicherung mit TiO <sub>2</sub> und LC-MS/MS-Analyse . . . . .	41
3.7	Aufbau des Programms Pepview . . . . .	43
4.1	Recovery des Phosphopeptids EAIpTAAPFAK-NH <sub>2</sub> (m/z = 549,3) von der TiO <sub>2</sub> -Säule bei Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 7 0,8 µl/min . . . . .	49

4.2	Elutionsprofil des Phosphopeptids EAIpTAAPFAK-NH <sub>2</sub> (m/z = 549,3) von TiO <sub>2</sub> -Säule bei Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 7 0,8 µl/min . . . . .	49
4.3	Recovery des Phosphopeptids EAIpSAAPFAK-NH <sub>2</sub> (m/z = 542,3) von der TiO <sub>2</sub> -Säule bei Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 9,5 2 µl/min . . . . .	51
4.4	Recovery der AQUA-Phosphopeptide RApSPPLFQSR (m/z = 619,8) und SNTHPpSPDDAFR (m/z = 712,3) von der TiO <sub>2</sub> -Säule bei Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 9,5, 2 µl/min . . . . .	52
4.5	Vergleich der direkten Messung des 7P-Mixes und nach Anreicherung über TiO <sub>2</sub> bei Elution mit 100 mM Zitronensäure pH 9,5 . . . . .	53
5.1	Identifizierte Interaktionspartner von mPer2 Teil 1/3 . . . . .	56
5.2	Identifizierte Interaktionspartner von mPer2 Teil 2/3 . . . . .	57
5.3	Identifizierte Interaktionspartner von mPer2 Teil 3/3 . . . . .	58
5.4	Pepview-Übersicht der normalen und kurzen Varianten von mPER1 . . . . .	60
5.5	Pepview-Übersicht der normalen und kurzen Varianten von mPER2 . . . . .	61
6.1	Vergleich der Chromatographie der phosphorylierten Peptide des 7P-Mix bei der LC-MS-Analytik über C <sub>18</sub> -Säulenmaterial und Injektion mit 0,1 % FA und 100 mM Zitronensäure . . . . .	67
6.2	Sequenzabdeckung von murinem mPER1, Verdau mit Trypsin, Elastase, Thermolysin, minimaler Mascot Score ≥15 . . . . .	69
6.3	Identifizierte Phosphorylierungsstellen von murinem mPER1, minimaler Mascot Score ≥15 . . . . .	70
6.4	Sequenzabdeckung von murinem mPER2, Verdau mit Trypsin, Elastase, Thermolysin, Chymotrypsin minimaler Mascot Score ≥15 . . . . .	71
6.5	Identifizierte Phosphorylierungsstellen von murinem mPER2 minimaler Mascot Score ≥15 . . . . .	72
6.6	Multiphosphorylierte Peptide von mPER1 und mPER2 (Teil 1) . . . . .	74
6.7	Multiphosphorylierte Peptide von mPER1 und mPER2 (Teil 2) . . . . .	75
6.8	Analyse der Phosphoisomere von AESVVSQCSFSSTIVHVGDK (mPER1) . . . . .	77
6.9	Analyse der Phosphoisomere von AESVVSQCSYSSTIVHVGDK (mPER2) . . . . .	78
6.10	Analyse der Phosphoisomere von FNSRCSSPLQ (mPER1) . . . . .	79
6.11	Analyse der Phosphoisomere von RASPPLEQSRGSSPLQL (mPER2) . . . . .	80
6.12	Analyse der Phosphoisomere von YFGSIDSEAEAGAAR (mPER1) . . . . .	81
6.13	Analyse der Phosphoisomere von YFGSIDSSFNNHK (mPER2) . . . . .	82
6.14	Fragmentspektren der Peptide ApSLPKASFPEELApYK und ASFPEELApYK, welche auf die Phosphorylierung des Tyrosins Y-576 hindeuten . . . . .	84
6.15	Fragmentspektrum des methylierten Peptids YLESCSEAATLKR . . . . .	85
6.16	Ansatz zur Lokalisierung der Methylierung durch den Vergleich von verschiedenen Peptiden . . . . .	86
6.17	Identifizierte Phosphorylierungsstellen und Methylierungsstelle von murinem mPER2 im Kontext bekannter Interaktionsmotive . . . . .	87

7.1	Arbeitsablauf für die labelfreie Bestimmung des Phosphorylierungsgrades .	91
7.2	Extracted-Ion-Chromatogramme von TLGTPSFGR, 2+ (A) und TLGT-SFGR, 2+ (B) nach Phosphopeptidanreicherung mit $\text{TiO}_2$ . . . . .	92
7.3	Extracted-Ion-Chromatogramme von TLGTPSFGR, 2+ (C) und TLGT-SFGR, 2+ (D) nach Phosphopeptidanreicherung mit $\text{TiO}_2$ und Dephosphorylierung mit $\lambda$ -Phosphatase . . . . .	93
7.4	Extracted-Ion-Chromatogramme von TLGTPSFGR, 2+ (A) und TLGT-SFGR, 2+ (B); direkte Messung im Hauptexperiment ohne vorherige Phosphopeptidanreicherung mittels $\text{TiO}_2$ . . . . .	96
7.5	Behinderung der Proteaseaktivität durch die Phosphorylierung . . . . .	97
8.1	Theoretische Vorteile der Isotopenmarkierung von Serin und Phosphoserin	100
8.2	Theoretische Massenspektren für die 0–3-fach phosphorylierten Peptide bei der chemischen Isotopenmarkierung . . . . .	101
8.3	Konzept der Isotopenmarkierung von Serin und Phosphoserin mit Acetanhydrid . . . . .	102
8.4	Guanidierung von Lysin mit O-Methylisoharnstoff . . . . .	103
8.5	Guanidierung von PKA mit O-Methylisoharnstoff am Beispiel des Peptids KGpSEQESVKEFLAK . . . . .	104
8.6	Veresterungsprodukte des Peptids SNTHPPSPDDAFR mit Ameisensäure und <i>N-N'</i> -Carbonyldiimidazol . . . . .	107
8.7	Veresterungsprodukte des Peptids SNTHPPSPDDAFR bei verschiedenen pH-Werten . . . . .	111
8.8	Veresterungsprodukte des Peptids SNTHPpSPDDAFR mit Acetanhydrid, PPY und DCC . . . . .	113
8.9	Veresterungsprodukte des Peptids SNTHPpSPDDAFR mit Acetanhydrid in THF mit Bismuttriflat . . . . .	113
8.10	Veresterungsprodukte des Peptids SNTHPpSPDDAFR mit Acetanhydrid in THF mit Bismuttriflat, Edukte mit 3 Å Molekularsieb getrocknet . . . . .	114
8.11	Nebenprodukte der Veresterung von Glu-Fib EGVNDNEEGFFSAR mit $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ und Acetanhydrid . . . . .	115
8.12	Dephosphorylierung von SNTHPpSPDDAFR mit Ceroxid unter alkalischen Bedingungen . . . . .	117
8.13	Dephosphorylierung von SNTHPpSPDDAFR mit 100 mM Cer(IV) und 50 mM Bis-Tris-Propan . . . . .	118
8.14	$\beta$ -Eliminierung von SNTHPpSPDDAFR mit La(III) und Bis-Tris-Propan bei 35 °C über Nacht; die Ausbeute an $\beta$ -Eliminierungsprodukt ist relativ niedrig. . . . .	119
8.15	$\beta$ -Eliminierung von EAIpSAAPFAK- $\text{NH}_2$ mit La(III) und Bis-Tris-Propan bei verschiedenen pH-Werten . . . . .	120
8.16	$\beta$ -Eliminierung von EAIpSAAPFAK- $\text{NH}_2$ mit La(III) Arginin, Bis-Tris-Propan und Tris . . . . .	121

8.17	$\beta$ -Eliminierung von TWpSL, TWpTV und SNTHPpSPDDAFR mit La(III), Bis-Tris-Propan und Triethylamin und anschließender Addition von $\beta$ -Mercaptoethanol . . . . .	123
9.1	Arbeitsablauf für das Labeling von Proteinen mit $^{15}\text{N}$ -Isotopen . . . . .	126
9.2	Arbeitsablauf für das $^{15}\text{N}$ -Isotopenlabeling der HEK293/Per2-V5 Zellen . .	127
9.3	Vergleich der gemessenen und berechneten Isotopenmuster von EEQGFLQR, 2+ leichte und schwere Variante . . . . .	130
9.4	Vergleich der gemessenen und berechneten Isotopenmusters von ApSPPLFQSR, 2+ leichte und schwere Variante . . . . .	131
9.5	Für die Erstellung der Extracted-Ion-Chromatogramme verwendete Bereiche des Isotopenmusters von EEQGFLQR, 2+ und ApSPPLFQSR, 2+ . .	132
9.6	Integrierte Extracted-Ion-Chromatogramme für den leichten und schweren Bereich des Isotopenmusters von EEQGFLQR, 2+ (A) und ApSPPLFQSR, 2+ (B) . . . . .	133
10.1	Mechanismus des säure- und basenkatalysierten $^{18}\text{O}$ -Labelings nach Murphy und Clay (1990) . . . . .	143
10.2	Apparatur zur Herstellung der schweren konzentrierten HCl . . . . .	144
10.3	Apparatur zum Entfernen der HCl nach Ende der Reaktion . . . . .	145
10.4	Theoretische Isotopenmuster von Glu-Fib EGVNDNEEGFFSAR, 2+ ungelabelt und nach $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	146
10.5	$^{18}\text{O}$ -Labeling von Glu-Fib mit FA und TFA . . . . .	147
10.6	$^{18}\text{O}$ -Labeling von Glu-Fib mit 5–10 % (v/v) TFA . . . . .	148
10.7	Base-Peak-Chromatogramme des $^{18}\text{O}$ -Labelings von Glu-Fib mit TFA . . .	149
10.8	Base-Peak-Chromatogramme von Glu-Fib für verschiedene Methoden zum Entfernen der Salzsäure nach dem Labeling . . . . .	151
10.9	Einbaurate der $^{18}\text{O}$ -Labels bei Glu-Fib nach Entfernen der Salzsäure durch verschiedene Methoden . . . . .	152
10.10	Gemessene und berechnete Isotopenmuster von Glu-Fib EGVNDNEEGFFSAR, 2+ unmarkiert und mit $^{18}\text{O}$ -Labeling in HCl . . . . .	153
10.11	Base-Peak-Chromatogramme von Glu-Fib EGVNDNEEGFFSAR, 2+ unmarkiert und mit $^{18}\text{O}$ -Labeling in HCl . . . . .	154
10.12	Fragmentspektren von Glu-Fib unmarkiert und mit $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	155
10.13	Gemessene und berechnete Isotopenmuster von RApSPPLFQSR, 3+ ungelabelt und mit $^{18}\text{O}$ -Labeling in HCl . . . . .	156
10.14	Gemessene und berechnete Isotopenmuster von RApSPPLFQSR (1 $\times$ phosphoryliert), 3+ unmarkiert und mit $^{18}\text{O}$ -Labeling in HCl . . . . .	157
10.15	Base-Peak-Chromatogramme von RApSPPLFQSR (1 $\times$ phosphoryliert), 3+ unbehandelt und mit $^{18}\text{O}$ -Labeling in HCl . . . . .	158
10.16	Vergleich der säurekatalysierten Dephosphorylierung von RApSPPLFQSR unbehandelt und mit $^{18}\text{O}$ -Labeling in HCl . . . . .	159
10.17	Isotopenmuster des Fragmentions $b_6$ , 1+ von RApSPPLFQSR . . . . .	160

10.18	Arbeitsablauf zur Isotopenmarkierung von Peptiden des Dionex-Mix mit $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff . . . . .	161
10.19	Berechnete und gemessene Isotopenmuster der Peptide GYLAVAVVK von TRFE und CCAADDKEACFAVEGPK von BSA nach $^{18}\text{O}$ -Labeling mit HCl . . . . .	163
10.20	Isotopenmuster mit Satellitenpeaks im Fragmentspektrum von GYLAVAVVK und CCAADDKEACFAVEGPK . . . . .	164
10.21	Fragmentspektren der leichten und schweren Variante des Peptids GYLAVAVVK von TRFE nach $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	165
10.22	Fragmentspektren der leichten und schweren Variante des Peptids CCAADDKEACFAVEGPK von BSA nach $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	166
10.23	Berechnete und gemessene Isotopenmuster des Peptids LVTDLTK von BSA nach $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	167
10.24	Lokalisierung der zusätzlichen Markierung mit $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff im Fragment-spektrum von LVTDLTK nach $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	168
10.25	Vermutlicher Mechanismus der Substitution von $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff am Peptid-grundgerüst N-terminal von Threonin . . . . .	169
10.26	Verteilung der gemessenen Verhältnisse (Schwer/Leicht) von Peptiden einer 1:1 Mischung des Dionex Mix nach $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	170
10.27	Arbeitsablauf zur säurekatalysierten Isotopenmarkierung von Phosphopep-tiden mit $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff und anschließender Anreicherung mit $\text{TiO}_2$ . . . .	172
10.28	Verteilung der Verhältnisse (Schwer/Leicht) einer 1:1-Mischung der Phos-phopeptide von PKA nach $^{18}\text{O}$ -Labeling mit HCl und Phosphopeptidanrei-cherung mit $\text{TiO}_2$ . . . . .	174
1	Sequenzvergleich von mPER1 und mPER2 mit eingetragenen Phosphorylie-rungsstellen Teil 1 . . . . .	204
2	Sequenzvergleich von mPER1 und mPER2 mit eingetragenen Phosphorylie-rungsstellen Teil 2 . . . . .	205
3	Analyse der Phosphoisomere von LLETSSKSTNSQSPSPSSS (mPER1)	206
4	Analyse der Phosphoisomere von MSPGPLHSPGSSSDSNGGDAEGPGPP-APV (mPER1) . . . . .	207
5	Analyse der Phosphoisomere von SYTASSASDDDKQRAGPVPV (mPER1)	208
6	Analyse der Phosphoisomere von LAPGPAPSPAPSPT (mPER1) . . . . .	209
7	Analyse der Phosphoisomere von LVEVTESSNQDALSGSSDLLE (mPER1)	210
8	Analyse der Phosphoisomere von VDFSPSPTSPTKEPGAPQPTQA (mPER2) . . . . .	211
9	Analyse der Phosphoisomere von MLVESSNTHPSPDDAFR (mPER2) . . .	212
10	Analyse der Phosphoisomere von LMMTEAEHNPSTSGCSSEQSAK (mPER2) . . . . .	213
11	Analyse der Phosphoisomere von SHVSHESGGQKEASVAFMQSSPPAQVK (mPER2) . . . . .	214
12	Analyse der Phosphoisomere von AVTTIERDSSGASLPK (mPER2) . . . .	215

## Abbildungsverzeichnis

13	Analyse der Phosphoisomere von KATVSPGLHSGEAARPSK (mPER2) . .	216
14	Analyse der Phosphoisomere von EDMASGPESLDGAAGGLSQEKGPLQ- KL (mPER2) . . . . .	217
15	Analyse der Phosphoisomere von NTSGLESSWKK (mPER2) . . . . .	218
16	Analyse der Phosphoisomere von VKTRDSSESTGSGGPVSHRPPLMG (mPER2) . . . . .	219
17	Analyse der Phosphoisomere von SGASATSDSLGSSSLGGTSQSGAGSSD- TSHTSK (mPER2) . . . . .	220
18	Analyse der Phosphoisomere von ICLPYEEDSPSPGLCDTSEAKEEEGEQ (mPER2) . . . . .	221
19	Pepview Software: Ansicht der ersten Seite . . . . .	248
20	Pepview Software: Ansicht weiterer Seiten . . . . .	249

# Tabellenverzeichnis

1.1	Vergleich der Quantitativen Methoden des Labeling mit Stablen Isotopen nach Capelo et al. (2010) . . . . .	20
3.1	Parameter der HPLC-Methoden für die einzelnen Schritte der Phosphopeptidanreicherung mit $\text{TiO}_2$ . . . . .	39
6.1	Publizierte Phosphorylierungsstellen von murinem mPER1 und mPER2 (Stand Oktober 2011) . . . . .	66
6.2	Verzeichnis der EICs der Phosphoisomere mehrfach phosphorylierter Peptide	73
7.1	Ergebnisse der Messungen zur Bestimmung des Verhältnisses der Ionisierungseffizienzen für das Peptidpaar TLGTGpSFGR/TLGTGSFGR, 2+ (S-53), Verdau mit Trypsin . . . . .	94
7.2	Ermittelter Phosphorylierungsgrad verschiedener Phosphorylierungsstellen von PKA nach Verdau mit verschiedenen Proteasen . . . . .	95
8.1	Auszug aus den Mascot-Suchergebnissen lysinhaltiger Peptide der Guanidierung von PKA in Lösung . . . . .	105
8.2	Auszug aus den Mascot-Suchergebnissen lysinhaltiger Peptide der Guanidierung von PKA im Gel . . . . .	106
8.3	Mascot-Suchergebnisse der Formylierung von SNTHPPSPDDAFR mit Ameisensäure und <i>N-N'</i> -Carbonyldiimidazol . . . . .	109
8.4	Mascot-Suchergebnisse der Succinylierung von SNTHPPSPDDAFR mit Bernsteinsäureanhydrid in Pyridin . . . . .	109
8.5	Mascot-Suchergebnisse der Succinylierung von SNTHPPSPDDAFR mit Bernsteinsäureanhydrid und Trifluoressigsäure in Tetrahydrofuran . . . . .	110
8.6	Mascot-Suchergebnisse der Succinylierung von SNTHPPSPDDAFR mit Bernsteinsäureanhydrid und Bernsteinsäure in Tetrahydrofuran und anschließender Dephosphorylierung mit Flusssäure . . . . .	110
9.1	Zuordnung der Modifikationen . . . . .	134
9.2	mPER2 $^{15}\text{N}$ -Quantifizierung des Trypsinverdaus (zweiter Versuch) . . . . .	136
9.3	mPER2 $^{15}\text{N}$ -Quantifizierung des Elastaseverdaus (zweiter Versuch) . . . . .	137
9.4	mPER2 $^{15}\text{N}$ -Quantifizierung des Thermolysinverdaus (zweiter Versuch) . . . . .	138
9.5	mPER2 $^{15}\text{N}$ -Quantifizierung des zweiten Thermolysinverdaues (zweiter Versuch) . . . . .	140
10.1	Einstellung der Mascot Quantifizierungsmethode für das $^{18}\text{O}$ -Labeling . . . . .	162

## Tabellenverzeichnis

10.2	Gemessene Verhältnisse der Proteine (Schwer/Leicht) einer 1:1 Mischung des Dionex-Mix nach $^{18}\text{O}$ -Labeling mit HCl . . . . .	162
10.3	Verhältnisse (Schwer/Leicht) einer 1:1-Mischung der Phosphopeptide von PKA nach Verdau mit verschiedenen Proteasen, $^{18}\text{O}$ -Labeling mit HCl und Phosphopeptidanreicherung mit $\text{TiO}_2$ . . . . .	173
1	Sequenzen der verwendeten Peptidstandards . . . . .	222
2	Sequenzen der Peptide des 7P-Mixes . . . . .	223
3	Proteinsequenzen der verwendeten Standardproteine . . . . .	227
4	mPER2 $^{15}\text{N}$ -Quantifizierung des Trypsinverdaus (erster Versuch) . . . . .	229
5	mPER2 $^{15}\text{N}$ -Quantifizierung des Elastaseverdaus (erster Versuch) . . . . .	230
6	mPER2 $^{15}\text{N}$ -Quantifizierung des Thermolysinverdaus (erster Versuch) . . . . .	231
7	Bovine serum albumin (Rind) unbehandelt - behandelt HCl 5 h 30 min $15^\circ\text{C}$ . . . . .	232
8	Apo-Transferine (Rind) unbehandelt - behandelt HCl 5 h 30 min $15^\circ\text{C}$ . . . . .	235
9	Alcohol dehydrogenase (Hefe) unbehandelt - behandelt HCl 5 h 30 min $15^\circ\text{C}$ . . . . .	238
10	$\beta$ -Galactosidase (E.Coli) unbehandelt - behandelt HCl 5 h 30 min $15^\circ\text{C}$ . . . . .	240
11	Cytochrome C (Rind) unbehandelt - behandelt HCl 5h30min 5 h 30 min $15^\circ\text{C}$ . . . . .	241
12	Lysozyme C (Huhn) unbehandelt - behandelt HCl 5 h 30 min $15^\circ\text{C}$ . . . . .	242
13	Mascot-Scoring des Dionex Mix beim $^{18}\text{O}$ -Labeling mit und ohne Satellitenpeak-Definitionen . . . . .	244



## Konferenzbeiträge und Publikationen

- Haaf, E., Lanner, U., Lamer, S. und Schlosser, A.: What are the best peptides for ETD?  
In: *42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Konstanz, Deutschland*. 2009.
- Haaf, E., Lanner, U., Lamer, S. und Schlosser, A.: Targeted phosphorylation site analysis by MRM. In: *43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Halle(Saale), Deutschland*. 2010.
- Haaf, E. und Schlosser, A.: High sequence coverage by combining CID of tryptic and ETD of non-tryptic peptides. In: *56th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Denver, Colorado, USA*. 2008.
- Haaf, E. und Schlosser, A.: Peptide and Protein Quantitation by Acid-Catalyzed 18O-Labeling of Carboxyl Groups. In: *Analytical Chemistry*, Band 84(1):S. 304–311, 2012.
- Seidler, J., Zinn, N., Haaf, E., Boehm, M. E., Winter, D., Schlosser, A. und Lehmann, W. D.: Metal Ion-Mobilizing Additives for Comprehensive Detection of Femtomole Amounts of Phosphopeptides by Reversed Phase LC-MS. In: *Amino Acids*, Band 41(2):S. 311–320, 2011.



# Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Freiburg, den 23. März 2012

Erik Haaf